

Thèse présentée par Magali Thierry

Pour obtenir le grade de

Docteur de L'université de La Réunion

Discipline : Biologie Animale et Ecologie

Ecole doctorale Interdisciplinaire

Laboratoire : UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical

Invasion biologique et isolement reproducteur au sein
du complexe *Bemisia tabaci* sur l'île de La Réunion

Soutenance prévue le 22 février 2011, devant un jury composé de

BESSE Pascale	Professeur, Université de La Réunion	Présidente
VAVRE Fleury	Directeur de Recherche, CNRS, Lyon	Rapporteur
PETERSCHMITT Michel	Directeur de Recherche, CIRAD, Montpellier	Rapporteur
REYNAUD Bernard	Directeur de Recherche, CIRAD, Réunion	Directeur de thèse
BECKER Nathalie	Chargé de Recherche-HDR, MNHN, Paris	Examinatrice
DELATTE Hélène	Chercheur, CIRAD Réunion	Examinatrice

Thèse présentée par Magali Thierry

Pour obtenir le grade de

Docteur de L'université de La Réunion

Discipline : Biologie Animale et Ecologie

Ecole doctorale Interdisciplinaire

Laboratoire : UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical

Invasion biologique et isolement reproducteur au sein
du complexe *Bemisia tabaci* sur l'île de La Réunion

Soutenance prévue le 22 février 2011, devant un jury composé de

BESSE Pascale	Professeur, Université de La Réunion	Présidente
VAVRE Fleury	Directeur de Recherche, CNRS, Lyon	Rapporteur
PETERSCHMITT Michel	Directeur de Recherche, CIRAD, Montpellier	Rapporteur
REYNAUD Bernard	Directeur de Recherche, CIRAD, Réunion	Directeur de thèse
BECKER Nathalie	Chargé de Recherche-HDR, MNHN, Paris	Examinatrice
DELATTE Hélène	Chercheur, CIRAD Réunion	Examinatrice

Cette thèse a reçu le soutien de la Région Réunion et d'un Fonds Structurel Européen



Résumé

Les invasions biologiques sont de plus en plus nombreuses et constituent un intérêt croissant pour l'étude des processus écologiques et évolutifs.

Le complexe d'espèces cryptique *Bemisia tabaci* est composé de nombreux biotypes, dont les biotypes B et Q, qui sont invasifs dans le monde entier, surtout connus pour les dégâts qu'ils occasionnent sur les cultures maraîchères par la transmission de phytovirus. Ces insectes hébergent une grande diversité de bactéries endosymbiotiques, connues chez d'autres groupes d'arthropodes pour jouer un rôle dans l'écologie et l'évolution de leur hôte.

L'île de La Réunion héberge les biotypes Q, B et un biotype Ms indigène de la zone sud-ouest de l'Océan Indien. En combinant les données de terrain, les données écologiques et moléculaires sur une période de presque dix années, l'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier la dynamique temporelle d'invasions biologiques et de comprendre comment le biotype résident réagit à ces introductions.

Tout d'abord, grâce à l'analyse de données moléculaires et à l'étude de la diversité de la communauté endosymbiotique présente dans les populations de *B. tabaci* à La Réunion nous avons pu décrire la première introduction du biotype Q sur l'île dont les groupes génétiques Q1 et Q2.

Pour la première fois, la diversité de la communauté endosymbiotique, la diversité génétique nucléaire et mitochondriale de *B. tabaci* ont été décrits sur l'île de La Réunion pour les biotypes B, Ms et leurs hybrides. Ces données ont pu être mises en lien avec des mécanismes potentiels d'isolement reproducteur postzygotiques entre les biotypes B et Ms. Cette étude montre l'association entre les différentes combinaisons symbiotiques et les différents biotypes. Le biotype Ms héberge majoritairement *Cardinium*, *Arsenophonus* et en plus faible prévalence *Rickettsia*. Le biotype B héberge exclusivement *Hamiltonella* et *Rickettsia*. Au sein des hybrides, la différenciation génétique est liée à leur symbiotype. Ils hébergent toutes les combinaisons symbiotiques décrites chez les biotypes B et Ms. Cependant, nous avons pu mettre en évidence des hybridations non aléatoires caractérisées par l'existence d'un déséquilibre nucléo-cytoplasmique chez les hybrides, entre la bactérie *Arsenophonus* et certains allèles typiques du biotype B générant probablement des barrières postzygotiques.

Grâce à l'étude phylogénétique de chacune des bactéries présentes dans nos populations, nous avons pu détecter une grande diversité nucléotidique au sein des bactéries *Arsenophonus* et *Cardinium*. Notamment, quatre souches différentes d'*Arsenophonus*, deux souches différentes de *Cardinium* ont pu être mises en évidence. Ces données révèlent également la possibilité de la présence de plusieurs souches d'*Arsenophonus* au sein d'un même individu de biotype Ms.

Enfin, les données écologiques et moléculaires analysées sur cinq périodes d'échantillonnage entre 2001 et 2010 montrent que les deux biotypes B et Ms occupaient le même habitat au sein des agrosystèmes pour la première période d'échantillonnage en 2001 et que, leurs préférences d'habitat se sont différenciées au cours du temps. Le biotype B montre une préférence pour l'habitat cultivé et le biotype Ms pour l'habitat adventice. Cette préférence d'habitat contribue à un isolement reproducteur prézygotique entre ces biotypes. La mise en évidence de ces barrières prézygotiques et postzygotique a pu être mis en lien avec une diminution significative des hybrides entre les biotypes B et Ms au cours du temps.

Ce travail de thèse a permis d'étudier la contribution de certaines barrières reproductrices aux flux de gènes dans le contexte d'invasions biologiques et donc de mieux comprendre les mécanismes écologiques et génétiques qui maintiennent la diversité dans les populations d'insectes.

Abstract

Biological invasions are becoming more and more common and constitute a growing interest in the study of ecological and evolution processes.

Bemisia tabaci is composed of numerous morphologically indistinguishable biotypes and is considered as a cryptic species. Biotypes B and Q are considered invasive worldwide and become a major problem both as a pest and as a vector of plant viruses. The occurrence of symbionts among arthropods is a common feature and it is likely that their capacity to engage microbial companions has greatly contributed to their evolutionary success. *B. tabaci* harbors a great diversity of these microorganisms.

In the south-west Indian Ocean, La Réunion hosts Q, B and the indigenous Ms biotypes. The purpose of this PhD thesis was to study the dynamic of the biological invasion and to understand the interactions between native and non native biotypes, combining field, ecological and molecular data over a nine year period.

First, thanks to a field survey carried out in 2010, evidences of the presence of Q1 and Q2 genetic groups of the invasive Q biotype in La Réunion were drawn from mitochondrial and endosymbiotic data.

The symbiont community prevalence and composition, host mitochondrial and nuclear genetic diversity, were described on field populations of La Réunion for B and Ms *B. tabaci* biotypes and their hybrids. These data could be linked to potential postzygotic reproductive barriers between B and Ms biotypes. Ms biotype harbors predominantly *Cardinium* and *Arsenophonus*, and *Rickettsia* in lower prevalence. The B biotype harbors exclusively *Hamiltonella* and *Rickettsia*. Among the hybrid population, genetic differentiation is linked to their symbiotype and individuals harbor all possible symbiotic combination described in the B and Ms biotypes. However, non random hybridisations were observed and could be linked to potential cytonuclear disequilibrium between *Arsenophonus* and some typical B biotypes alleles, causing potential postzygotic isolation.

Symbiont phylogenetic studies were conducted for each symbiont detected in our field population. A great nucleotidic diversity was found within *Arsenophonus* and *Cardinium*. In particular, we found four different *Arsenophonus* strains and two different *Cardinium* strains. The hypothesis of multiple infections by different strains of *Arsenophonus* within an individual could be drawn from these data.

Finally, ecological and molecular data from five sample periods (2001-2010) showed that both B and Ms biotypes were able to colonize the habitat constituted of weeds for the first sampling period. Their habitat preferences have evolved over time. The B biotype shows a habitat preference for crops and the Ms biotype for weeds. These data show the contribution of habitat preference to prezygotic isolating barriers. The emphasis of prezygotic and postzygotic barriers could be linked with the decrease of hybrids over time.

This PhD thesis allowed us to study the contribution of some reproductive barriers to gene flow in the context of biological invasions and thus, allowed us to better understand ecological and genetic mechanisms that maintain diversity in populations.

Remerciements

Apprendre, réapprendre, chercher, se tromper, avoir confiance, prendre le recul, se questionner sans cesse, aller au bout des choses... Une thèse, c'est un peu tout ça en même temps.

Hélène, Nathalie, ces trois années passées ensemble ont été incroyablement riches pour moi, personnellement et scientifiquement. Je vous remercie de tout mon cœur de votre encadrement « hors pair », de votre incroyable disponibilité et surtout de toute la confiance que vous m'avez accordée pendant ce « petit » bout de vie ensemble. Ce trio a plutôt très bien fonctionné, ce n'était pas tous les jours facile, mais vous avez toujours été là pour me remettre sur le chemin sinueux de la science...

Je me rappellerai toujours, un jour de manip au labo, de voir Jean-Michel, Bernard, Nathalie et Hélène débarquer en salle « PCR mix », avec de grands sourires pour m'annoncer que mon projet de thèse était retenu. Nous étions tous fiers, même si je pensais aussi au fond de moi « mais dans quoi me suis-je embarquée... ». Merci à tous les quatre d'avoir tout fait pour que ce projet se réalise.

Jean-Mi, nos chemins se sont vite séparés, juste le temps de faire une superbe mission à Mayotte, très riche humainement (pas vraiment en *Bemisia*), qui m'a permis de découvrir Mayotte sous un autre angle et de sortir du labo de biologie moléculaire... Je te remercie de tout mon cœur d'avoir été présent dans les moments difficiles et encore plus pour toutes les tartes aux fraises !

Je remercie Fabrice Vavre et Michel Petterschmitt, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci également à Pascale Besse d'avoir accepté de présider ce jury.

Je voulais également remercier la Région Réunion et le CIRAD qui ont financé cette thèse et surtout l'UMR PVBMT pour m'avoir permis de la réaliser. Je remercie aussi particulièrement le Pôle de Protection des Plantes et son directeur Bernard Reynaud, pour m'avoir permis de travailler dans des conditions idéales.

Je ne crois pas que j'aurais pu réaliser ce travail sans avoir été entourée, épaulée, pendant ces trois années de thèse.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler et partager des moments de vie au labo, sur le terrain, en pause clope, en pause déjeuner : Martial, Mumu, Ahmed, Audrey, Remy, « les filles de biomol », Leila, Rachel, Céline, Pierre, Chloe, Vincent, Pierre (la folie des 18h), Rodolphe, Azali, Cathie, Fred, Dominique&Daniel, Estelle et beaucoup d'autres...

Pour notre quotidien dans le bureau 1-42, premier étage, dans le fond du couloir, à gauche, merci à toi Leila. Je n'aurais pas pu mieux tomber je crois, nous nous sommes épaulées, nous avons rit, discuter de Science dans tous ses sens...

Pour tout, pour ce que je suis, merci à mes parents qui m'ont construit solidement, et accompagné dans les surprises que la vie nous réserve. Merci à mes frères, toujours là pour moi, pour guider leur petite sœur ! Merci à Titane, Ruth, Loulou...

Merci à ma deuxième famille, Michelle, Fred, Boubou, Baptiste, Soëlie, Papoune, Madile, les lolos, Joëlle, Pascal...vous m'avez soutenu tout ce temps, merci d'avoir pris soin de moi.

Les potes, c'est encore une autre famille. Je vous remercie les « zamis du bord de l'eau » de cette force que vous me donnez au jour le jour. Nous sommes parfois trop loin les uns des autres, mais heureusement, il paraît que La Loire coule jusqu'ici...

Merci à mes parisiennes préférées Soph, Momo, Clo, à vos mecs, et à vos marmay.

Merci à tous les amis avec qui je partage mon quotidien sur l'île, Mathilde (mon ptit riton), Flo, Rachel&Vincent, Doudou&Aurélie, Annette&Francois, Ju&Franki, Guimo, Greg&Nanou, Fab, TomTom, Imane.

Et à ceux qui sont partis de l'île (beaucoup trop à mon goût): Zordi, Anto, Thierry, Stef&Marco, Elise, Mahdi, Bud, François, « Lamicale des Réunionnais »...

Merci au village de l'impasse de la falaise (ce n'est pas complètement une secte !) pour les baleines, le Mimulus, le Pouce du Panda, les piles du clavier (merci Mooglie), la famille Jamon, la charcuterie basque. Et évidemment, merci à toi Garf, de supporter une « coloc-amie » comme moi, je sais que ce n'est pas toujours facile...

Merci à tous ceux qui m'ont accompagné musicalement : Babet&Boochon bien sûr, mais aussi Neil Young and crazy horse, Serge Gainsbourg, Erik Satie, Bobby Lapointe (pour les angevines de poitrine), Alain Peters, Arno, Les Rita, Burt Bacharach et son « What the world needs now », Johnny Cash, Iggy Pop, Alain Bashung, Creedence Clearwater, Nina Simone...

Et comme diraient Les Pierres qui Roulent :

« You can't always get what you want,
But if you try sometimes,
You might find,
You get what you need".

Table des matières

Introduction	1
<i>I. A. Problématique des invasions en milieu insulaire.....</i>	<i>2</i>
<i>I. B. Evolution de l'isolement reproducteur.....</i>	<i>5</i>
I. B. 1. Isolement reproducteur prézygotique	5
I. B. 2. Isolement reproducteur postzygotique	7
<i>I. C. Endosymbiose chez les arthropodes.....</i>	<i>8</i>
I. C. 1. Origine, transmission et diversification.....	8
I. C. 2. Endosymbiotes et rôle	12
I. C. 3. Rôle des endosymbiotes dans la spéciation.....	17
<i>I. D. Le modèle Bemisia tabaci.....</i>	<i>18</i>
I. D. 1. Les biotypes : origine et diversité génétique	18
I. D. 2. Biologie et répartition géographique	21
I. D. 3. Les endosymbiotes chez <i>B. tabaci</i>	24
<i>I. E. Contexte et objectifs</i>	<i>25</i>
I. E. 1. Contexte	25
I. E. 2. Objectifs.....	27
Chapitre I. Première description du biotype Q à la Réunion	29
Chapitre II. Diversité symbiotique et hybridation non-aléatoire.....	39
Chapitre III. Diversité génétique des symbiotes secondaires de <i>B. tabaci</i>...	62
Chapitre IV. Évolution temporelle de l'isolement reproducteur entre deux biotypes de <i>B. tabaci</i>.....	72
Discussion générale	86
Références.....	99

Introduction

I. A. Problématique des invasions en milieu insulaire

Les écosystèmes insulaires sont remarquables de part leur originalité en terme de faune et de flore. Même si la diversité spécifique dans les milieux insulaires est plus faible que celle observée dans les milieux continentaux, les îles sont riches de formes présentes nul part ailleurs, c'est-à-dire de formes endémique¹ de ces îles (Whittaker 1998). En milieu insulaire, l'endémisme y atteint des records, par exemple : 68.4% d'endémisme à Madagascar ou encore 37.5% d'endémisme dans les Mascareignes (Ile Maurice et Ile de la Réunion) ont été mentionnés (Whittaker 1998).

Les espèces habitant dans ces milieux sont également caractérisées par des traits d'histoire de vie particuliers, regroupés sous le terme de « syndrome d'insularité » par Blondel (1995). La surface réduite des îles, leur isolement géographique ainsi que les particularités décrites ci dessus, entraînent d'une part un nombre limité d'espèces et d'autre part des modalités d'évolution particulières. L'absence de flux migratoires constants et les effectifs de populations souvent limités (dérive génétique plus intense) vont favoriser la différenciation insulaire.

Toutes ces caractéristiques permettent plus facilement d'étudier et de modéliser les processus à l'œuvre dans l'évolution des espèces (Barbault & Atramentowicz 2010) et font des milieux insulaires de véritables

« laboratoires naturels de l'évolution ». Alfred Russel Wallace dans son livre *Island Life*

... it is not too much to say that when we have mastered the difficulties presented by the peculiarities of island life we shall find it comparatively easy to deal with the more complex and less clearly defined problems of continental distribution.

(1880) résumait déjà cette vision du monde insulaire (extrait ci-contre, p230).

Par conséquent, ces milieux sont hélas d'autant plus fragiles puisqu'ils ont évolué vers des adaptations très particulières, et que la moindre perturbation peut avoir des conséquences dramatiques sur l'écosystème.

¹ Une espèce est dite endémique d'une aire géographique donnée, en général restreinte, quand sa présence est exclusivement limitée à cette aire.

C'est le cas des perturbations provoquées par l'introduction de nouvelles espèces dites « invasives² ». Les espèces autochtones sont souvent mal adaptées et mauvaises compétitrices face aux espèces allochtones (Lockwood *et al.* 2007).

Les invasions biologiques ont bien sûr toujours existé depuis les origines de la vie, mais elles s'accroissent de façon dramatique avec l'intervention de l'homme qui les propage aux quatre coins de monde (Barbault & Atramentowicz 2010).

Toutes les espèces introduites ne s'installent pas forcément durablement, il faut qu'elles puissent franchir quelques étapes primordiales : leur introduction, leur établissement, leur expansion, et leur impact sur le milieu (Lockwood *et al.* 2007; Blackburn *et al.* 2008).

L'accroissement des introductions biologiques conduit souvent à la mise en contact des espèces ou des populations qui peuvent encore s'hybrider entre elles (Mooney & Cleland 2001).

En effet, lorsque qu'une espèce se sépare en plusieurs populations différentes sous l'effet de barrières géographiques, ces deux populations peuvent évoluer séparément (allopatrie). Lorsque de nouveaux changements mettent à nouveau ces populations en contact (sympatrie), il existe plusieurs issues potentielles à ce nouveau contact :

- Une des espèces mène l'autre à l'extinction
- Les deux espèces coexistent
- Les deux espèces peuvent fusionner en une seule par la possibilité de flux génétiques entre elles
- Un faible taux d'hybrides entre les deux espèces peut être maintenu dans des conditions stables.

Ces différents scénarios ne sont pas rares lorsqu'on parle d'introduction et d'invasion biologique. Dans les deux premiers cas, les deux espèces présentent et mettent en place des barrières d'isolement prézygotiques et postzygotiques qui les empêcheront de se croiser.

² Une espèce non native envahissante est une espèce exogène dont l'introduction et/ou la dispersion met en péril la diversité biologique Williamson MH (1996) *Biological invasions* Chapman & Hall.

L'aleurode *Bemisia tabaci* est reconnu comme une des cent espèces les plus invasives au monde (Global Invasive Species Database <http://www.issg.org/database/welcome>).

Sur l'île de La Réunion, *B. tabaci* (*Bemisia manihotis* (Frappa 1937) synonymisé en 1952 avec *B. tabaci* par Takahashi et Mamet) est

Si la mosaïque n'est pas représentée ici, ce qui est d'ailleurs surprenant, nous avons cependant rencontré au Jardin Colonial de St-Denis et au Piton St-Leu un aleurode paraissant identique à *Bemisia manihotis* Frappa, récemment décrit, de Madagascar où on le considère comme le vecteur de l'affection. Nous ne saurions donc trop engager le Gouvernement de l'île de la Réunion à se montrer très prudent en ce qui concerne l'introduction de nouvelles boutures de manioc car la maladie, si elle pénétrait dans le pays, pourrait facilement se propager.

décrit pour la première fois en 1938 par Bourriquet (Bourriquet 1938) (voir extrait de cet article ci-dessus). Quinze ans plus tard, Luziau (1953) décrit de nouveau *B. tabaci* sur le territoire réunionnais. En 1997 la forte épidémie de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) qui sévit sur les cultures de tomates de l'île (Peterschmitt *et al.* 1999 ; Reynaud *et al.* 2003) est rapidement associée à des pullulations d'aleurodes *B. tabaci*. Les analyses génétiques associant des marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et *COI* (cytochrome oxydase I) montrent la présence de deux types génétiques. Le premier est le biotype B invasif, aujourd'hui cosmopolite. Le second est un biotype indigène de la zone du Sud Ouest de l'Océan indien, qui n'a jamais été décrit auparavant : Ms pour « Mascareignes » (Delatte *et al.* 2005), également décrit au cours de cette même étude aux Seychelles, à Mayotte, à Madagascar et à l'île Maurice. Le biotype B, dans cette zone, n'est présent que sur l'île de La Réunion (Delatte *et al.* 2005) et à l'île Maurice (Ganeshan & Abeeluck 2000). Sur l'île de La Réunion comme dans le monde, le biotype B induit typiquement des symptômes d'argenture sur les feuilles de certaines espèces de cucurbitacées (*silverleafing* (Yokomi *et al.* 1995)). Les populations de Ms induisent également ces symptômes (Delatte *et al.* 2005). Il a été prouvé que ces deux biotypes étaient capables de transmettre le TYLCV à des taux de transmission équivalents (Delatte *et al.* 2005).

Dans ce contexte d'invasion biologique de *B. tabaci* à La Réunion, nous nous sommes attachés dans cette introduction à développer plusieurs parties qui permettront de comprendre les mécanismes qui peuvent expliquer le devenir des populations invasives et indigènes à La Réunion. La première partie offre des informations sur les différentes barrières d'isolement reproducteur qui existent entre des populations précédemment isolées géographiquement.

La deuxième partie se concentre sur l'endosymbiose bactérienne dans le cas plus particulier des insectes. La troisième partie décrit le modèle de *B. tabaci*. Enfin nous nous attacherons à préciser les contexte et objectif de la thèse.

I. B. Evolution de l'isolement reproducteur

De nombreuses définitions de « l'espèce » ont été proposées (Coyne & Orr 2004), la définition la plus communément acceptée est celle du concept biologique de l'espèce (Barton 2001), qui définit les espèces par leur interfécondité (*interbreeding*). La définition du concept biologique d'espèce a été proposée par Dobzhansky (1937) et Mayr (1963) comme « des groupes de populations naturelles, interfécondes et qui sont reproductivement isolées d'autres groupes de populations ». En adoptant cette définition, le terme de « spéciation » reflète l'évolution des mécanismes qui entravent les échanges de gènes entre des taxons émergents (Turelli *et al.* 2001).

Comment ces isolements entre espèces proches, vivant dans une même zone, se sont mis en place ? La réponse est qu'il existe des barrières d'isolement qui préviennent la reproduction entre individus d'espèces différentes. Une barrière d'isolement ont été définit comme tout caractère évolué présent chez deux espèces et qui les empêchent de se reproduire. Ces barrières peuvent être prézygotiques ou postzygotiques (Mayr 1963; Dobzhansky 1970).

L'isolement prézygotique signifie que les zygotes ne se forment jamais. Cet isolement peut se produire avant ou après l'accouplement. L'isolement postzygotique, quant à lui, signifie que les zygotes se forment, mais que les hybrides issus de l'accouplement ne sont pas viables ou ne sont pas fertiles.

I. B. 1. Isolement reproducteur prézygotique

I. B. 1. a) Les barrières prézygotiques

Les barrières d'isolement prézygotique empêchent la copulation ou bien entravent la fécondation. Plusieurs formes de barrières d'isolement prézygotique ont été décrites et ont été classées ainsi par Dobzhansky (1970) et Mayr (1963):

– **L'isolement écologique:**

○ L'isolement de l'habitat ou l'isolement des ressources :

Les différences d'habitats occupés ou de ressources exploitées par des espèces différentes diminuent la probabilité d'accouplements et contribuent donc à l'isolement reproducteur. C'est par exemple le cas du diptère *Rhagoletis sp.*, dont des populations d'une même espèce se sont spécialisées sur deux plantes hôtes différentes et se sont ainsi isolées pour se scinder en deux espèces distinctes (Dres & Mallet 2002). Ainsi, *Rhagoletis pomonella* s'est spécialisé sur une espèce d'aubépine et *R. mendax* sur la myrtille, la différenciation génétique entre ces espèces proches est à ce jour très forte (Feder *et al.* 1989; Berlocher 1995). De plus, aucun hybride n'a été détecté au cours du suivi d'une centaine d'individus des deux espèces sur les deux plantes hôte présentes dans le même buisson (Feder *et al.* 1989).

○ L'isolement temporel :

Certaines espèces d'insectes recherchent un partenaire pour seulement quelques heures dans la journée ou dans la nuit, et d'autres espèces proches font de même, mais à des périodes différentes comme c'est le cas pour certaines espèces proches de cigales *Magicicada* (Cooley *et al.* 2003). L'isolement peut être également saisonnier, comme c'est le cas pour deux espèces proches de grillons *Gryllus veletis* et *G. pennsylvanicus* dont les stades matures surviennent au printemps et à l'automne respectivement (Alexander 1967).

– **L'isolement comportemental ou sexuel :**

Cet isolement est probablement le plus commun et représente la plus importante barrière au flux de gènes entre des espèces sympatriques qui se rencontrent fréquemment mais qui ne s'accouplent pas (Futuyma 1986). L'attractivité entre les deux sexes d'espèces différentes est absente ou différente, les individus de deux espèces ne se reconnaissent pas comme partenaires sexuels. Par conséquent, un individu préfère s'accoupler avec un autre individu qui lui ressemble (*assortative mating*) (pour revue, (Futuyma 1986).

L'isolement mécanique intervient lorsque les organes reproducteurs diffèrent en termes de structure. C'est surtout le cas chez les plantes, par exemple les fleurs de *Mimulus lewisii* sont adaptées à un type particulier de pollinisateur (le colibri) conduisant à un isolement avec les fleurs de *M. cardinalis* adaptées à un autre pollinisateur (l'abeille) (Ramsey *et al.* 2003).

- Enfin il existe des barrières prézygotiques mais qui ont lieu après l'accouplement. C'est le cas de l'**isolement gamétique**, c'est-à-dire que les gamètes de deux espèces différentes ne se fertilisent pas. La compétition gamétique (entre les gamètes mâles) par exemple, peut ne favoriser que les gamètes appartenant à la même espèce (pour exemple : compétition gamétique entre *Tribolium castaneum* et *T. freemani* (Wade *et al.* 1994)).

I. B. 2. Isolement reproducteur postzygotique

I. B. 2. a) Les barrières postzygotiques

Les barrières postzygotiques sont caractérisées par une valeur sélective (*fitness*) nulle ou presque des hybrides issus de deux populations. Les individus des deux populations s'accouplent et forment un zygote mais la descendance n'est pas viable, ou bien non fertile (Mayr 1963; Dobzhansky 1970).

L'isolement postzygotique peut être caractérisé d'extrinsèque ou d'intrinsèque :

- Dans l'**isolement extrinsèque**, la viabilité et la stérilité des hybrides dépend de l'environnement, c'est-à-dire que les hybrides sont mal adaptés à l'habitat de leurs parents (pour exemple chez le complexe d'espèce de poissons *Coregonus clupeaformis* (Rogers& Bernatchez 2006))

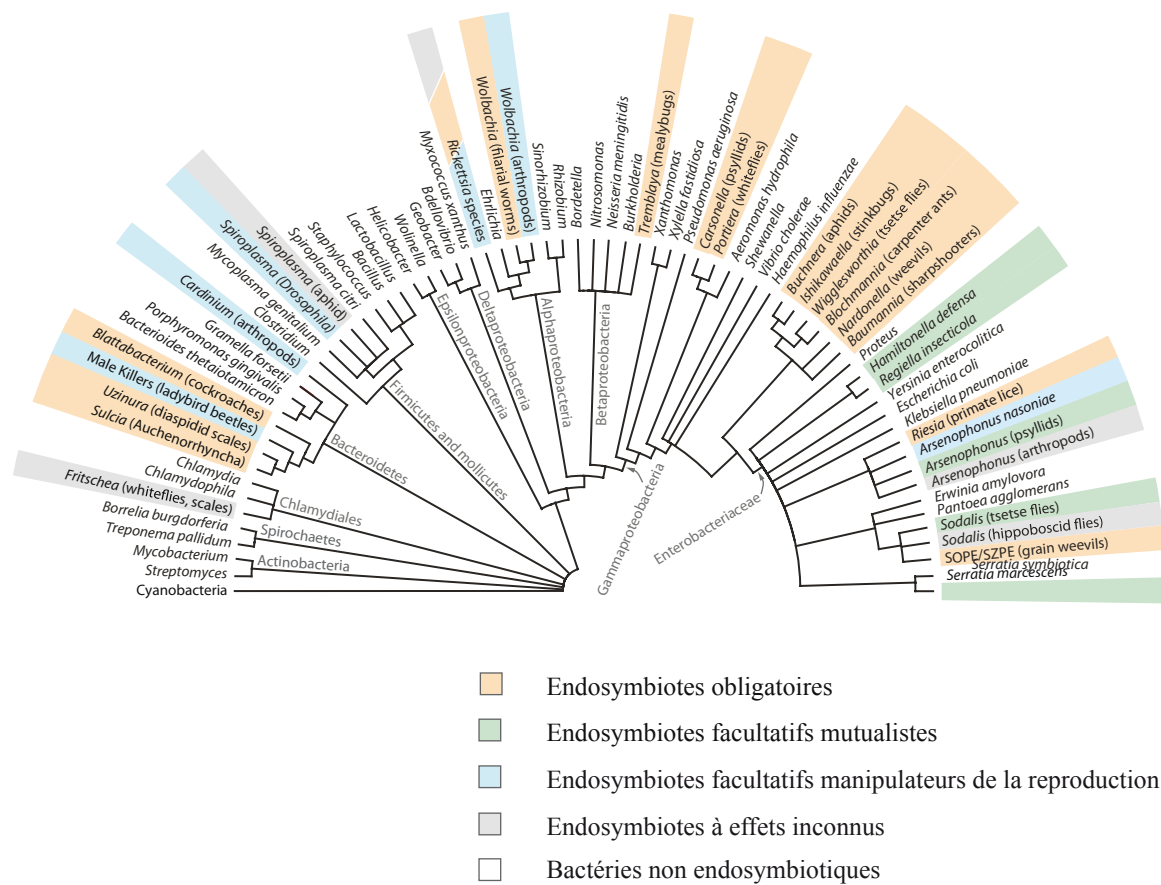


Figure 1. Origine et diversité des endosymbiontes d'insectes. Arbre phylogénétique représentant la diversité et la distribution ubiquiste des endosymbiontes obligatoires et facultatifs d'insectes au sein de nombreux groupes de bactéries. Schéma issu de Moran *et al.* (2008).

- **L'isolement intrinsèque** reflète des anomalies de développement souvent causées par des interactions épistatiques³ délétères entre les allèles parentaux indépendamment de l'environnement. Pour exemple Presgraves *et al.* (2003) ont identifiés un gène responsable d'interactions épistatiques et qui provoque la non viabilité des hybrides entre *Drosophila simulans* et *D. melanogaster*. Chez certains insectes, la présence de bactéries endosymbiotiques peut également jouer ce rôle de barrières postzygotiques à la viabilité ou à la stérilité des hybrides. Ce sujet sera développé par la suite dans l'introduction de ce manuscrit.

I. C. Endosymbiose chez les arthropodes

En 1879, Anton De Bary définit en premier le terme de « symbiose » comme « des organismes différents vivant ensemble ». Dans cette définition, De Bary englobe tout type d'interactions entre deux partenaires, du mutualisme (bénéfice réciproque) au commensalisme (interaction neutre) en passant par le parasitisme (profit d'un des deux protagonistes). Toutefois, cette théorie tombe dans l'oubli pendant près d'un siècle, et c'est seulement en 1965 que Paul Buchner rétablit ce terme dans son ouvrage *Endosymbiosis of animals with plants and microorganisms* (Buchner 1965). Il définit par ailleurs un nouveau concept, celui de l'endosymbiose, qui se caractérise par une symbiose intracellulaire où l'un des organismes est présent à l'intérieur des cellules de l'organisme hôte.

I. C. 1. Origine, transmission et diversification

I. C. 1. a) Origine des endosymbiotes

Les endosymbiotes d'insectes montrent une extraordinaire diversité avec une distribution ubiquiste dans de nombreux groupes différents de bactéries (Figure 1).

L'avènement des méthodes de biologie moléculaire a permis de mieux comprendre les origines phylogénétiques des différents endosymbiotes d'insectes.

³ Interactions physiques moléculaires entre différentes protéines (et entre d'autres éléments génétique) Phillips PC (2008) Epistasis [mdash] the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews Genetics* **9**, 855-867.

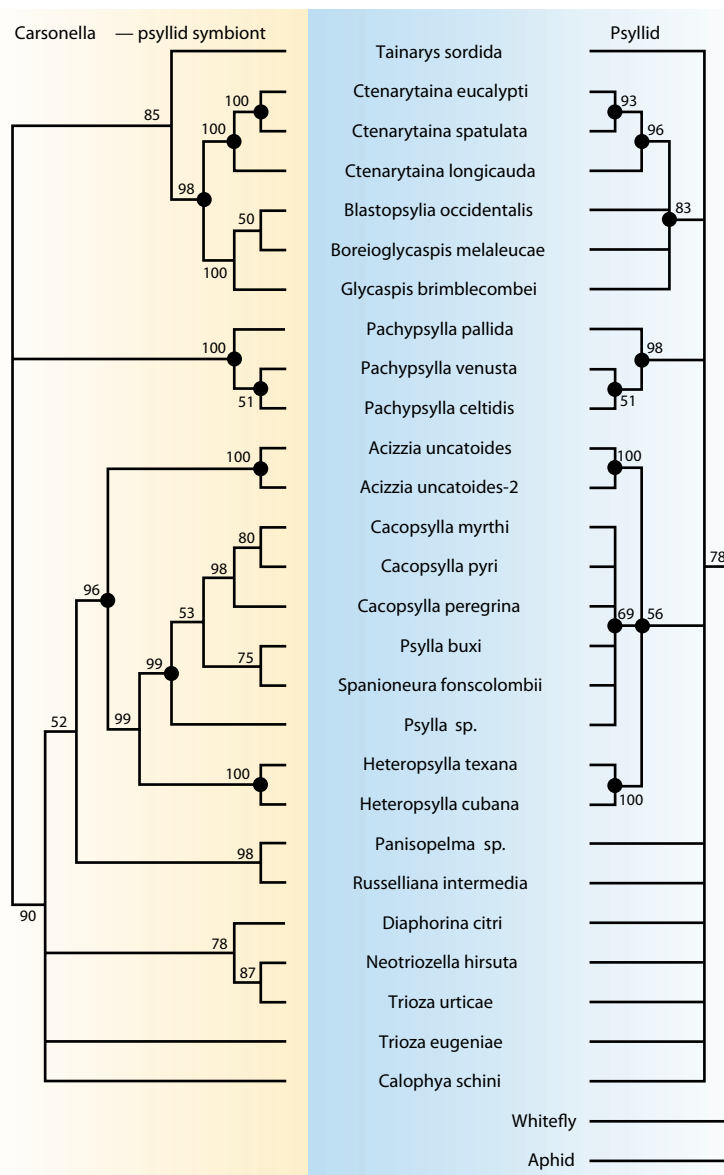


Figure 2. Co-diversification entre les endosymbiotes primaires et leurs hôtes. La cospéciation est représentée par la congruence des phylogénies de *Carsonella rudii* (estimée à partir du 16S et du 23S de l'ARN ribosomique) et de leur hôte de la famille des psylles (estimée à partir d'un gène nucléaire). Les valeurs de bootstrap sont indiquées à chaque nœud (1000 répétitions). Les nœuds qui coïncident entre la phylogénie de l'endosymbiote primaire et des hôtes sont représentés par des ronds pleins. Figure issue de Wernegreen *et al.* (2002).

Les analyses phylogénétiques ont porté sur des séquences d'ARN ribosomal (16S, 18S, 23S) (Baumann 2005; Moran *et al.* 2005; Hosokawa *et al.* 2006), sur des séquences de gènes multiples codant pour des protéines (pour exemples (Gil *et al.* 2003; McCutcheon *et al.* 2009)) ou sur le contenu de gènes pour des génomes entièrement séquencés (Comas *et al.* 2007). Globalement, ces analyses montrent : *i*) qu'il existe de nombreuses origines, apparues indépendamment au cours de l'évolution et qui proviennent de groupes très différents au sein des bactéries ; *ii*) que bien qu'ubiquistes, ces bactéries sont concentrées au sein de certains groupes tels que les Gammaproteobactéries (et plus particulièrement les Enterobactéries) ainsi qu'au sein du phylum des Bacteroidetes ; *iii*) que les bactéries endosymbiotiques ont des liens de parenté très proches avec des bactéries dites « libres » comme *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ou *Pseudomonas aeruginosa*, qui pourraient être à l'origine des bactéries endosymbiotiques, *iv*) que leur génome est réduit par rapport à celui des bactéries libres, certaines fonctions étant assurées par la cellule hôte devenue indispensable (pour revue : (Wernegreen 2002; Moran *et al.* 2008)).

I. C. 1. b) Endosymbiotes mutualistes obligatoires

Bien qu'il existe des intermédiaires, deux catégories d'endosymbiotes peuvent être décrites. La première catégorie rassemble les endosymbiotes obligatoires mutualistes (l'hôte et l'endosymbiote tirent tous deux profit de l'interaction), également nommés endosymbiote primaire ou P-symbiote (Buchner 1965). Ils sont ubiquistes puisque distribués au sein de 4 phylum chez les Bactéries (*Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, et *Bacteroidetes*). De plus ils sont nécessaires au développement de l'hôte parce qu'ils synthétisent les acides aminés et les nutriments indispensables à la survie de celui-ci (Baumann 2005; Douglas *et al.* 2006). Les endosymbiotes primaires montrent des patrons de co-diversification avec leur hôte, illustrés par la parfaite congruence entre les phylogénies de la bactérie et de son hôte (Figure 2), résultat d'une très ancienne association, maintenue par la stricte transmission verticale par voie transovarienne de ces bactéries (pour revue : (Buchner 1965; Wernegreen 2002)). Cette co-diversification des endosymbiotes primaires et de leur hôte a été montrée pour de nombreux groupes d'insectes. L'âge de la mise en place d'une infection peut être connu grâce à l'âge de l'hôte fourni par les données fossiles.

Ainsi la datation des fossiles d'insectes de la famille des *Aphididae*, dévoile que l'association originelle avec l'endosymbiote primaire *Buchnera aphidicola* s'est mise en place il y a environ 180 millions d'années (Moran *et al.* 1993). Basée sur des taux de changements nucléotidiques au sein d'un même clade bactérien, l'association entre l'endosymbiote primaire *Portiera aleyrodidarum* et les insectes de la famille des *Aleyrodoidea* est également estimée à environ 180 millions d'années (pour revue : (Baumann 2005)).

Ces bactéries sont localisées dans des organes spécialisés appelés bactériocytes, le plus souvent regroupées entre elles pour former un tissu, le bactériome ((Buchner 1965) qui se localise à différents endroits dans le corps selon les groupes d'insecte (Figure 3).

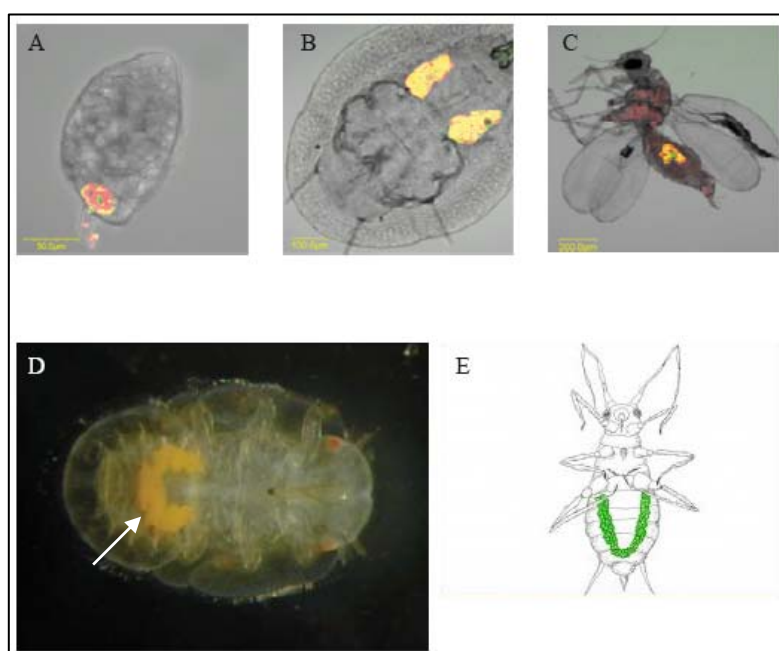


Figure 3. Localisation des bactériocytes chez *Bemisia tabaci* par immunofluorescence (A, B et C) et chez un puceron (D et E). Bactériocytes dans un œuf (A), une larve (B) et un adulte (C) de *Bemisia tabaci* (Skaljac *et al.* 2010). Bactériocytes dans une larve (D, flèche) (crédit photographique Nancy Moran) et un adulte (E, en vert) de puceron

Une des principales caractéristique de la plupart des endosymbiotes primaires est leur transmission verticale par voie transovarienne, c'est-à-dire que la femelle hôte transmet l'endosymbiote à la génération suivante par l'intermédiaire de ses œufs (Buchner 1965). Cette transmission a bien été caractérisée chez *Buchnera*, endosymbiote primaire des insectes de la famille des *Aphididae* (Buchner 1965).

Les cellules de *Buchnera* sont transmises depuis le bactériocyte de la femelle hôte à travers une petite ouverture puis elles migrent dans l'hémolymph de l'hôte et entre à la surface de l'œuf fertilisé. Ensuite, pendant les premiers stades de développement embryonnaire, les cellules de *Buchnera* migrent dans le bactériocyte en formation (Buchner 1965). Chez certains insectes de l'ordre des hémiptères (cochenilles, aleurodes et psylles), la transmission des cellules d'endosymbiote à travers l'œuf se fait par l'intermédiaire de l'association des bactériocytes avec les ovarioles de l'insecte (pour revue (Wernegreen 2002)).

I. C. 1. c) Distribution et origine des endosymbiotes facultatifs

La deuxième catégorie d'endosymbiotes regroupe, quant à elle, les endosymbiotes facultatifs aussi nommés endosymbiotes secondaires ou S-endosymbiotes (Buchner 1965). Tout comme les endosymbiotes primaires, ils sont également ubiquistes, puisqu'on les retrouve parmi les *Enterobacteriaceae*, les *Alphaproteobacteria*, les *Mollicutes* et les *Bacteroidetes*. Au contraire des endosymbiotes primaires, les endosymbiotes secondaires ne sont pas indispensables au développement de l'hôte (Buchner 1965).

Les endosymbiotes secondaires facultatifs sont aussi transmis verticalement par voie maternelle (Buchner 1965). Cependant, au contraire des endosymbiotes primaires, les reconstructions phylogénétiques des endosymbiotes secondaires ne sont pas congruentes avec celles de leur hôte (Baumann 2005). De nombreuses études phylogénétiques montrent que des espèces proches d'insectes partagent les mêmes souches de bactéries secondaires, et que leur présence varie entre les populations d'une même espèce. Ces deux éléments majeurs indiquent l'existence de transferts horizontaux entre espèces d'insectes ou au sein d'une même espèce (pour revue : (Baumann 2005), pour exemple : (Russell *et al.* 2003; Zchori-Fein & Perlman 2004). L'avantage pour les populations de bactéries est de pouvoir infecter de nouvelles lignées d'hôtes et donner lieu à de nouvelles symbioses. La plupart des études sont basées sur des données phylogénétiques qui mettent en évidence des transferts horizontaux d'endosymbiotes entre différentes espèces de pucerons (Sandstrom *et al.* 2001; Russell *et al.* 2003), de psylles (Thao *et al.* 2000), de drosophiles (Werren & Jaenike 1995) et entre des ennemis naturels tels que les parasitoïdes et leurs hôtes (Vavre *et al.* 1999). Seules quelques études expérimentales ont pu montrer la transmission horizontale des endosymbiotes.

Moran et Dunbar (2006) ont montré que la transmission intraspécifique entre mâles et femelles de pucerons verts du pois *Acyrtosiphon pisum* avait lieu au cours de l'accouplement. Les transferts horizontaux à l'échelle interspécifique ont pu être montrés après co-parasitisme, d'une espèce à l'autre, au sein du genre de guêpes parasitoïdes *Nasonia* pour le symbiote secondaire *Arsenophonus* (Duron *et al.* 2010). Trois espèces de parasitoïdes de *B.tabaci* du genre *Eretmocerus* et *Encarsia* semblent également capable d'acquérir en laboratoire le symbiote secondaire *Rickettsia* présent chez l'aleurode *B. tabaci* (Chiel *et al.* 2009b).

Ces transferts horizontaux permettent ainsi la mise en place de nouvelles symbioses et de multiples acquisitions d'endosymbiotes par l'hôte (pour revue (Moran *et al.* 2008)).

I. C. 2. Endosymbiotes et rôle

Deux stratégies se dégagent au sein du mode de fonctionnement des endosymbiotes secondaires : les endosymbiotes mutualistes qui confèrent un avantage sélectif à l'hôte en augmentant sa survie et sa fécondité (Hedges *et al.* 2008; Oliver *et al.* 2010) et les endosymbiotes parasites de la reproduction qui se propagent en augmentant la reproduction de l'hôte par l'intermédiaire des femelles aux dépens des mâles (Engelstadter & Hurst 2009). Les endosymbiotes secondaires représentent donc une force évolutive et écologique majeures au sein de nombreuses espèces d'hôte.

I. C. 2. a) Facultatifs mutualistes

Les endosymbiotes secondaires mutualistes protègent leur hôte face aux stress liés à l'environnement. L'intérêt des deux partenaires est donc réciproque puisque ces stratégies permettent à l'insecte hôte d'améliorer sa *fitness* et donc à l'endosymbiote de se disperser et de se maintenir au sein des populations d'insectes (Oliver *et al.* 2010). Le rôle des endosymbiotes secondaires sur la fitness de leurs hôtes a été étudié sous de nombreux aspects.

En voici quelques exemples :

- De nombreux pucerons sont vulnérables à la chaleur et leurs traits de vie tels que la fécondité, la survie, la durée de développement peuvent être dramatiquement modifiés à des températures supérieures à 25°C (Ma *et al.* 2004). Montlor *et al.*(2002) et Chen *et al.*(2000) ont montré, par des expériences en laboratoire, que *Serratia symbiotica* (ou PASS : Pea Aphid Secondary Symbiont), l'endosymbiote secondaire du puceron *A. pisum*, jouait un rôle bénéfique sur sa reproduction en conditions de stress thermique. Une étude plus récente menée par Russel&Moran (2006) confirme le bénéfice de *S. symbiotica* face à des traitements à la chaleur et montre également qu'*Hamiltonella defensa* augmente la survie des pucerons mais pas leur fécondité, ni leur durée de développement. Burke *et al.* (2009) émettent l'hypothèse que *S. symbiotica* libèrerait des métabolites protecteurs pour le puceron ou pour l'endosymbiote primaire. Certaines bactéries endosymbiotiques auraient donc un effet dans l'adaptation à des facteurs abiotiques et pourraient expliquer les profils de distribution géographique et saisonniers des pucerons.
- En milieu naturel, la plupart des insectes sont confrontés aux attaques de nombreux organismes, tels que les champignons, les prédateurs et les parasitoïdes. Les bactéries endosymbiotiques secondaires associées à ces insectes peuvent fournir une protection efficace contre ces agressions. Encore une fois, les études se sont portées sur le puceron *A. pisum*. L'hyménoptère *Aphidius ervi* est un de ses parasitoïde. Oliver *et al.* (2003) a montré que les pucerons infectés par les endosymbiotes *S. symbiotica* et *H. defensa* diminuaient les chances de parasitisme en tuant les larves d'*A. ervi*. Ces mêmes auteurs ont également montré que la co-infection de pucerons par *S. symbiotica* et *H. defensa* leur confèreraient une résistance contre les parasitoïdes encore plus importante que lorsque les pucerons sont infectés par une seule de ces bactéries (Oliver *et al.* 2006). Le champignon entomopathogène *Pandora neoaphidis* est un des pathogènes majeurs chez les insectes de la famille des aphididae. Scarborough *et al.* (2005) ont montré par des expériences en laboratoire que l'association du puceron avec l'endosymbiote secondaire *Regiella insecticola* (PAUS : Pea Aphid U-type Symbiont) empêchait la sporulation du champignon et que *R. insecticola* était présent uniquement lorsque *P. neoaphidis* l'était dans l'environnement.

- La présence de ces endosymbiotes secondaires est donc primordiale pour la résistance du puceron à ses ennemis naturels.
- Les endosymbiotes secondaires peuvent influencer les performances des insectes sur certaines plantes hôtes, c'est le cas de *Regiella insecticola* associé au puceron *A. pisum*. Leonardo & Muriu (2003) et Tsuchida *et al.* (2004) ont montré que cette bactérie était impliquée dans l'adaptation de l'insecte au trèfle blanc (*Trifolium repens*) aux Etats Unis et au Japon.

I. C. 2. b) Facultatifs parasites

La deuxième catégorie d'endosymbiotes secondaires est représentée par les endosymbiotes ayant évolué vers le parasitisme de la reproduction. Ces parasites modifient le *sex-ratio* et le mode de reproduction de leur hôte à leur profit (Breeuwer & Werren 1990; Ishikawa 2003). Les bactéries endosymbiotiques mises en cause sont capables d'induire quatre types de phénotypes connus, qui leur permettent d'envahir efficacement les populations d'hôtes : la féminisation des mâles, la parthénogénèse, le *male-killing* et l'incompatibilité cytoplasmique (Figure 4.)

Les trois premiers phénotypes décrits ci-dessous induisent une modification du *sex-ratio* en faveur des femelles :

- La féminisation (F) des mâles : lorsqu'une femelle infectée produit un zygote mâle, celui-ci se transforme en femelle au cours du développement. Ce phénotype est connu dans de nombreux groupes d'arthropodes notamment chez les lépidoptères et les hémiptères (pour exemple (Negri *et al.* 2006; Narita *et al.* 2007)). Les symbiotes connues pour induire ce phénotype sont *Wolbachia pipientis* (Hiroki *et al.* 2002; Negri *et al.* 2006) et *Cardinium hertigii* (Weeks *et al.* 2001). Le mécanisme mis en cause est mal connu mais il pourrait être dû au blocage de la formation des glandes androgènes, responsables de la différenciation des mâles (Martin *et al.* 1990; Weeks *et al.* 2001)

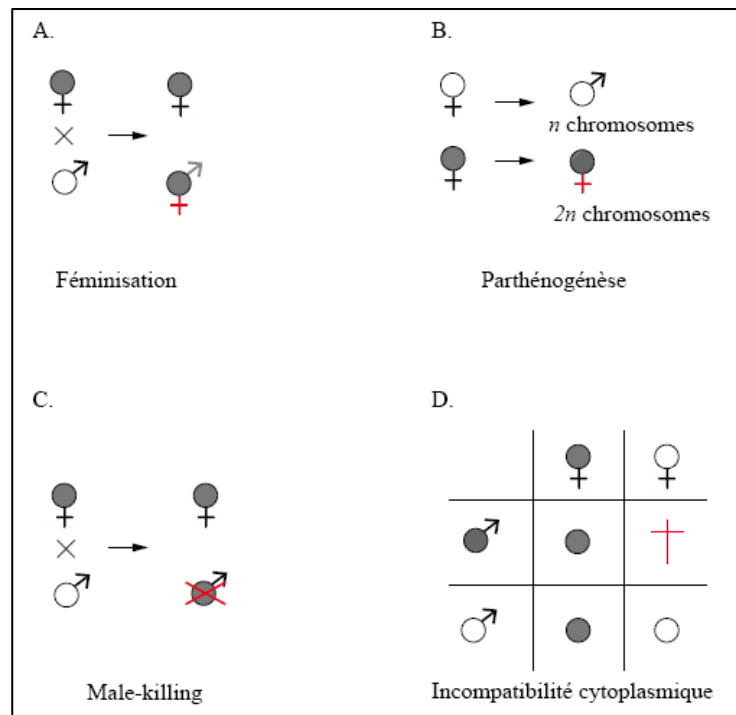


Figure 4. Phénotypes induit par les endosymbiotes secondaires parasites de la reproduction. A : phénotype induisant la féminisation des mâles issus de croisements entre un mâle et une femelle infectée par le parasite, l'infection est représentée en gris. B : phénotype induisant la parthénogénèse. Dans le système de reproduction parthénogénétique thélytoque, les mâles haploïdes (n chromosomes) sont issus de femelles non fécondées diploïdes ($2n$ chromosomes). Lorsque la femelle est infectée par le parasite, elle produit des femelles diploïdes non fécondées. C : phénotype induisant le male-killing. Les croisements entre une femelle infectée et un mâle non infecté par le parasite induisent la mort de la descendance mâle. D : phénotype induisant l'incompatibilité cytoplasmique. Les croisements issus d'un mâle infecté et d'une femelle non infectée ne produisent pas de descendance. Les autres croisements sont compatibles.

- L'induction de la parthénogénèse (PI): Ce phénotype est connu chez de nombreux groupes d'arthropodes haplo-diploïdes, tels que les hyménoptères, les coléoptères, les thysanoptères et les acarins (Huigens & Stouthamer 2003). Les mâles haploïdes (n chromosomes) sont issus d'œufs non fécondés et la bactérie mise en cause dans ce phénotype induit la diploïdisation des œufs non fécondés, produisant alors des femelles ($2n$ chromosomes). De nombreuses études montrent l'implication de *Wolbachia* dans l'induction de ce phénotype (Huigens & Stouthamer 2003). Les symbiotes *Cardinium* (Zchori-Fein *et al.* 2001) et *Rickettsia* (Hagimori *et al.* 2006) sont également décrits pour causer la féminisation chez plusieurs espèces de parasitoïdes.

Les deux phénotypes décrits ci-dessus, la féminisation et la parthénogénèse, ont un intérêt évident pour l'endosymbiote transmis maternellement : il transforme l'hôte non vecteur (le mâle) en vecteur (la femelle) (Engelstadter & Hurst 2009).

- Le *male-killing* (MK): Deux types de *male-killing* ont été décrits : le précoce et tardif (Hurst 1991). Le premier type provoque la mort des mâles au stade embryonnaire, il a été décrit chez les coléoptères, les diptères, les hyménoptères, les lépidoptères et cinq genres de bactéries en sont responsables : *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Flavobacteria* et *Arsenophonus* (cités dans (Nakanishi *et al.* 2008). Le deuxième type, le *male-killing* tardif, provoque la mort des mâles aux stades larvaires. Ce phénotype a été décrit beaucoup plus sporadiquement, chez le moustique *Aedes stimulans* et provoqué par des microsporidies (Andreadis 1985), chez la drosophile *D. subquinaria* provoqué par *Wolbachia* (Jaenike 2007).
- L'incompatibilité cytoplasmique (IC) est un phénotype qui a été détecté dans tous les grands groupes d'insectes (pour revue (Engelstadter & Telschow 2009) et qui a été d'abord découvert chez le moustique *Culex pipiens* infecté par *Wolbachia* (Yen & Barr 1971) : le cas le plus simple est l'IC unidirectionnelle où les croisements entre un mâle infecté et une femelle non infectée sont incompatibles et provoquent la mort des embryons. En conséquence, la proportion de femelles infectées augmente, ce qui est un avantage pour le symbiote transmis maternellement. L'IC bidirectionnelle apparaît lorsque le mâle et la femelle portent des souches différentes de bactéries provoquant l'IC, l'incompatibilité se produit alors dans les deux directions de croisement (Nirgianaki *et al.* 2003). Son spectre d'hôte est impressionnant, puisqu'elle est présente chez au moins 20% des arthropodes (arachnides, insectes, malacostracés) (Duron *et al.* 2008a). Le deuxième genre bactérien induisant ce phénotype, *Cardinium* infecte environ 7% des arthropodes (Duron *et al.* 2008b) et a été découvert beaucoup plus récemment chez le parasitoïde *Encarsia pergandiella* (Hunter *et al.* 2003; Perlman *et al.* 2008) et chez l'acarien *Eotetranychus suginamensis* (Gotoh *et al.* 2006).

I. C. 3. Rôle des endosymbiotes dans la spéciation

L'idée de l'implication des endosymbiotes dans les processus de spéciation d'hôtes, a vu le jour dès le début du XX^e siècle avec les travaux d'Ivan E. Wallin (1927) sur la nature bactérienne des mitochondries. D'après lui, les bactéries n'étaient pas seulement pathogènes mais pouvaient également provoquer des changements phénotypiques majeurs chez l'hôte conduisant ainsi à la naissance de nouvelles espèces. Depuis, de nombreuses évidences ont montré l'implication des endosymbiotes dans l'évolution de l'isolement reproducteur entre les espèces (Margulis & Fester 1991; Bordenstein 2003). Il n'est pas difficile d'imaginer leur rôle dans la spéciation aux vues des nombreuses adaptations et manipulations de la reproduction qu'ils imposent à leurs hôtes (voir les paragraphes ci-dessus).

Les insectes phytophages sont connus pour avoir évolué vers une relation intime et très spécialisée avec leur plante hôte, qui en effet leur sert d'habitat, de ressources nutritives et de zone de reproduction (Berlocher & Feder 2002). En effet, la spécialisation de plante hôte pourrait conduire une espèce à se scinder en deux espèces, chacune spécialisée sur une plante hôte particulière. Comme nous l'avons vu précédemment dans l'interaction puceron (*Acyrtosiphon pisum*) endosymbiote secondaire (*Regiella insecticola*)-trèfle blanc (*Trifolium repens*), certains endosymbiotes secondaires mutualistes induisent chez leur hôte une augmentation de la valeur sélective sur certaines plantes hôtes (Tsuchida *et al.* 2004).

Les endosymbiotes secondaires parasites de la reproduction pourraient également jouer un rôle dans l'évolution de l'isolement reproducteur. Les études sont en majorité basées sur l'IC induite par *Wolbachia* (Werren 1997; Bordenstein 2003; Telschow *et al.* 2007). En effet, l'IC empêche les flux de gènes entre populations infectées et non infectées, faisant évoluer les divergences génétiques et conduisant à la sélection de l'isolement prézygotique par renforcement⁴ (Bordenstein *et al.* 2001; Jaenike *et al.* 2006; Telschow *et al.* 2007).

⁴ Le renforcement, dans son sens large, représente l'augmentation de l'isolement prézygotique entre des populations qui s'hybrident en réponse à tout type de sélection contre les croisements interspécifiques, quelques soit la valeur sélective des hybrides formés. Servedio MR, Noor MAF (2003) THE ROLE OF REINFORCEMENT IN SPECIATION: Theory and Data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**, 339-364.

Bordenstein *et al.* (Bordenstein *et al.* 2001) ont montré que *Wolbachia* induisait de l'isolement postzygotique chez deux espèces proches de parasitoïdes *Nasonia giraulti* et *N. longicornis*. Les auteurs ont montré qu'en curant les insectes pour éliminer *Wolbachia*, les hybrides entre les deux espèces étaient viables et fertiles. Ainsi, l'isolement postzygotique induit par la bactérie précéderait d'autres mécanismes d'isolement postzygotique comme la non-viabilité et la stérilité des hybrides. Donc *Wolbachia* peut contribuer, en même temps que d'autres mécanismes, à l'isolement entre populations. Telschow *et al.* (2005) ont confirmé par une étude théorique que l'IC induite par *Wolbachia* en conjonction avec des incompatibilités génétiques liées à la divergence géographique contribuaient à mettre en place des processus de renforcement entre deux populations.

I. D. Le modèle *Bemisia tabaci*

I. D. 1. Les biotypes : origine et diversité génétique

I. D. 1. a) Systématique de *B. tabaci*

La systématique de *B. tabaci* (Gennadius) (Insecta : Hemiptera : Sternorrhynca : Aleyrodoidea : Aleyrodidae : Aleyrodinae) a toujours été pleine de rebondissements et de complexité, conduisant la communauté scientifique à définir *B. tabaci* comme un complexe d'espèces cryptiques.

Bemisia tabaci a été décrit pour la première fois en 1889 comme insecte ravageur sur des plants de tabac en Grèce et ainsi nommé *Aleurodes tabaci* (Gennadius 1889). Le premier spécimen découvert aux Etats-Unis (1897) avait été collecté sur patate douce et fut décrit comme un nouveau genre, avec *Bemisia inconspicua* comme espèce « type » (Quaintance & Baker 1914). Ce n'est qu'en 1957 que cette espèce, ainsi qu'une dizaine d'autres espèces d'aleurodes, furent mises en synonymie (regroupement d'espèces) dans un même taxon : *Bemisia tabaci* (Russell 1957).

La classification des aleurodes est basée sur la morphologie du dernier stade larvaire plutôt que sur les adultes, qui diffèrent très peu morphologiquement (Gill 1990). L'observation d'une grande variabilité morphologique du dernier stade larvaire, liée aux caractéristiques physiques de la plante hôte, ont amené les systématiciens à opérer à de nombreuses mises en synonymies (Tableau 1).

Tableau 1. Evènements majeurs du statut taxonomique de *Bemisia tabaci*. Tableau reproduit à partir de Perring *et al.* (Perring 2001)

Evènements majeurs	Références
Description de <i>Aleurodes tabaci</i>	Gennadius, 1889
Nouveau genre décrit : <i>Bemisia</i> avec <i>B. inconspicua</i> comme espèce type	Quaintance and Baker, 1914
<i>Bemisia achyranthes</i> synonymisée avec <i>Bemisia gossypiperda</i>	Corbett, 1935
<i>Bemisia hibisci</i> synonymisée avec <i>B. tabaci</i>	Takahashi, 1936
<i>B. hibisci</i> et <i>B. rhodensis</i> placés dans le sous genre <i>Bemisia</i> (<i>Neobemisia</i>)	Visnya, 1941
<i>Bemisia manihoti</i> et <i>Bemisia vayssierei</i> synonymisées avec <i>B. tabaci</i>	Takahashi and Mamet, 1952
<i>Aleurodes inconspicua</i> , <i>Bemisia costa-limai</i> , <i>Bemisia bahiana</i> , <i>Bemisia signata</i> , <i>Bemisia gossypiperda</i> , <i>Bemisia gossypiperda</i> var. <i>mosaicivectura</i> , <i>Bemisia longispina</i> , <i>Bemisia goldingi</i> , and <i>Bemisia nigeriensis</i> , <i>Bemisia rhodesiaensis</i> synonymisées avec <i>B. tabaci</i>	Russell, 1957
<i>Bemisia minima</i> and <i>Bemisia miniscula</i> synonymisées avec <i>B. tabaci</i>	Danzig, 1966
<i>Bemisia inconspicua</i> , <i>Bemisia emiliae</i> , et <i>Bemisia lonicerae</i> synonymisées avec <i>B. tabaci</i> .	Mound and Halsey, 1978
Les autres espèces synonymes listées incluent <i>Aleyrodes tabaci</i> , <i>Bemisia inconspicua</i> , <i>Bemisia ameliae</i> , <i>Bemisia gossypiperda</i> , <i>Bemisia</i> (<i>Neobemisia</i>) <i>hibisci</i> , <i>Bemisia</i> (<i>Neobemisia</i>) <i>rhodesiaensis</i> , et <i>Bemisia lonicerae</i>	

Bemisia tabaci fut alors décrit comme un « complexe d'espèces cryptiques », c'est-à-dire satisfaisant la définition biologique d'une espèce, qui définit une population reproductivement isolée d'une autre population, mais dont la morphologie ne permet pas de les distinguer (Lane 1997). La difficulté qui découle de la description des espèces cryptiques réside dans le choix de caractères supplémentaires pour identifier leur statut taxonomique.

I. D. 1. b) Histoire des biotypes et critères taxonomiques

Bemisia. tabaci est donc décrit comme un complexe d'espèces cryptiques composé de nombreuses populations biologiquement et génétiquement différentes nommées « biotypes » (Brown *et al.* 1995a; Frohlich *et al.* 1999a). La description de ces biotypes est principalement basée sur le polymorphisme enzymatique, le polymorphisme génétique, la gamme de plantes hôtes, la fécondité, le comportement de dispersion, et la capacité à transmettre des virus de plante (Perring 2001).

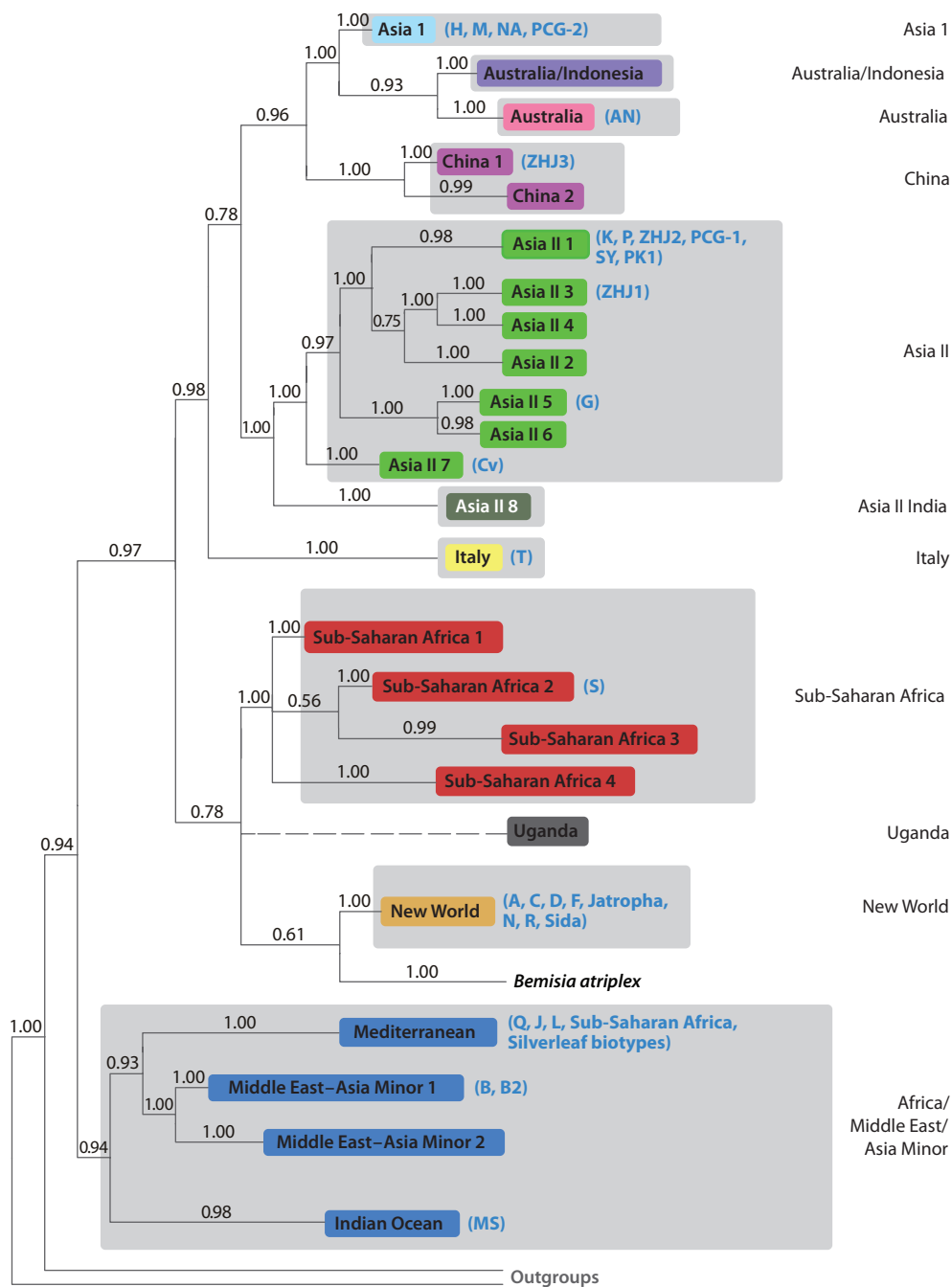


Figure 5. Relations phylogénétiques entre les différents groupes génétiques de *Bemisia tabaci*. Arbre phylogénétique construit à partir du gène mitochondrial de 201 haplotypes, représentant les 24 espèces cryptiques (encadrement de couleur) regroupés en 11 groupes génétiques (encadrements gris). Seules les probabilités supérieures à 0.5 sont représentées. Les biotypes précédemment définis sur des caractères écologiques et biologiques sont indiqués entre parenthèse. Figure issue de De Barro *et al.* (2010).

A ce jour, au moins 37 biotypes ont été identifiés sur ces critères : A, AN, B, B2, C, Cassava, Cv, D, E, F, G (Inde), G (Guatemala), H, I, J, Jatropha, K L, M, Ms, N, NA, Okra, P, PCG-1, PCG-2, PK1, Q, R, S, Sida, SY, T, ZHJ1, ZHJ2 et ZHJ3 (De Barro *et al.* 2010).

A l'aide du regroupement des informations morphologiques, biologiques et génétiques, décrites dans de nombreuses études, Perring *et al.* (2001) ont regroupé dans sept groupes distincts, 16 biotypes décrits grâce aux profils estérase ainsi que 3 biotypes dont le profil estérase est inconnu.

La première reconstruction phylogéographique fut effectuée chez le biotype B à l'aide de gènes mitochondriaux de la cytochrome oxydase I (*COI*) et du gène de la sous-unité ribosomique 16S (Frohlich *et al.* 1999b). L'étude montre i) une différenciation génétique liée à l'origine géographique et montre que ii) le biotype B aurait été introduit sur le continent américain à partir de régions d'Israël et du Yémen. Peu de temps après, à l'aide des analyses du gène nucléaire « intergenic transcribed spacer 1 » (*ITS1*), De Barro *et al.* (2000) montrent six groupes génétiquement différenciés révélant également un patron géographique fort. Boykin *et al.* (2007) ont pu mettre en évidence, grâce à l'analyse du gène *COI* sur plus de 300 spécimens, 12 groupes génétiquement différents. L'étude récente menée par Dinsdale *et al.* (2010) sur ce même gène en analysant 201 haplotypes de biotypes différents, définit 24 espèces cryptiques, appartenant à 11 groupes génétiques (Figure 5). Ces différents groupes génétiques ne se recoupent pas forcément entre les études et avec la diversité des caractères taxonomiques utilisés, la résolution du complexe d'espèces cryptiques chez *B. tabaci* reste encore incertaine. D'une part, certaines données biologiques et écologiques ne sont pas toujours disponibles (barrières reproductrices, spécialisations écologiques) et d'autre part les données génétiques ne suffisent pas toujours à délimiter nettement les groupes génétiques ou les espèces.

I. D. 1. c) Les tentatives de croisements entre biotypes

L'évolution du complexe d'espèce chez *B. tabaci* reste donc difficile à appréhender. Depuis le début des années 90, de nombreuses études ont montré l'absence de flux de gènes entre les biotypes différents.

Encore une fois, c'est avec les biotypes B et Q que la majorité des expériences d'incompatibilité de reproduction mettant en jeu des croisements ont été effectuées afin de mieux comprendre leur capacité invasive. Les croisements effectués par Costa *et al.* (1993), Perring *et al.* (1993) et Bedford *et al.* (1994) montrent l'incapacité des biotypes A et B à se croiser. De la même manière, Zang *et al.* (2006), Liu *et al.* (2007), De Barro *et al.* (2010) ont montré l'incompatibilité de reproduction entre B et les biotypes indigènes de Chine ZHJ1 et ZHJ2 et le biotype Australien AN. Cependant, quelques études ont montré la production d'hybrides entre le biotype B et d'autres biotypes. C'est le cas des croisements entre B et un biotype indigène du Soudan (Byrne *et al.* 1995), entre B et un biotype d'Australie (Gunning *et al.* 1995; De Barro & Hart 2000), entre B et le biotype Q d'Espagne (groupe Q1) (Ronda *et al.* 1999), entre B et les biotypes A et Jatropha (Brown *et al.* 2001) et enfin, entre B et le biotype Ms (Delatte *et al.* 2006). Dans ces études, la fertilité des hybrides produits n'a pu être démontrée.

D'autres études montrent également l'incompatibilité d'accouplement entre différentes populations de *B. tabaci*, notamment entre des populations de Côte d'Ivoire, associées au Manioc et au Gombo qui ne produisent pas d'hybrides lorsqu'ils occupent une même plante hôte (Burban *et al.* 1992). Le même cas a été rapporté en Uganda entre des populations des deux biotypes « Manioc » et « patate douce » (Legg 1995).

Il existe donc des niveaux variables d'incompatibilité de reproduction entre les différents groupes génétiques de *B. tabaci* qui pourraient également être liés au niveau de différenciation génétique entre les biotypes. Ces incompatibilités de reproduction dévoilent la complexité des barrières d'isolement de reproduction qui se mettent en place dans ce complexe d'espèce.

I. D. 2. Biologie et répartition géographique

I. D. 2. a) Cycle biologique

En général, les œufs de *B. tabaci* sont pondus sur la face inférieure des feuilles et sont munis à leur base d'un court pédicelle servant à la fixation au support végétal. Fraîchement déposés, ils sont de couleur blanchâtre et virent progressivement au marron au cours de leur développement embryonnaire (Gerling 1990) (Figure 6).

Le mécanisme de ponte de *B. tabaci* est conforme au cas général de la famille sauf que l'insertion du pédicelle a lieu directement dans les tissus foliaires et non à travers les stomates comme le font de nombreux *Aleyrodidae* (Paulson & Beardsley 1985).

Le développement larvaire de *B. tabaci* se réalise en 4 stades (L1 à L4). Les larves néonates (L₁) représentent le seul stade larvaire mobile chez cette espèce. Les stades suivants s'accompagnent d'un grossissement de la larve et de quelques changements morphologiques. Le dernier stade larvaire ou puparium (L4) est le siège d'une quasi-métamorphose (apparition de taches oculaires et d'ébauches de pattes et d'ailes), plaçant cet insecte à la charnière de l'hétérométabolie et de l'holométabolie. L'émergence de l'adulte se fait à travers une ouverture médiane en forme de T dans la partie antérieure du puparium (Berlinger 1986; Gerling 1990).

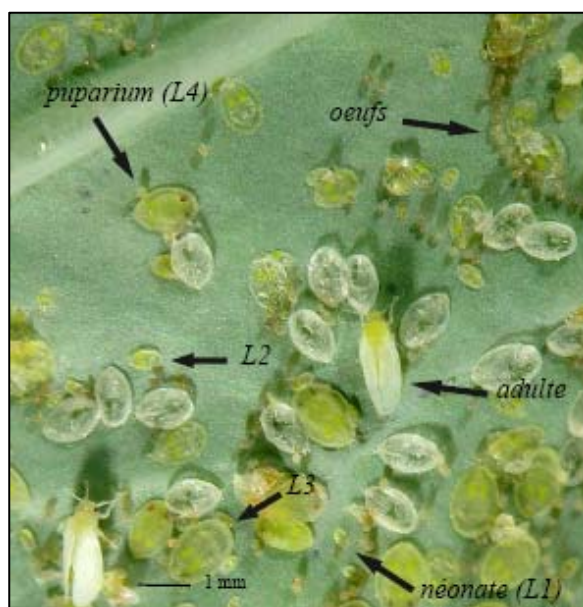


Figure 6. Photo d'adultes de *Bemisia tabaci* et des différents stades du cycle biologique, du stade néonate (L1) au stade puparium (L4) en passant par les stades intermédiaires L2 et L3 (photo Antoine Franck, CIRAD)

L'accouplement a lieu sur la plante hôte et se produit plusieurs fois au cours de la vie de l'adulte (Liu *et al.* 2007). Au sein de cette espèce, les mâles sont haploïdes alors que les femelles sont diploïdes. La reproduction est de type parthénogénétique arrhénotoque. C'est-à-dire que les femelles diploïdes proviennent d'un œuf fertilisé alors que les mâles proviennent d'un œuf non fertilisé (Berlinger 1986).

A.



B.



C.



Figure 7. Dégâts occasionnés par la transmission de virus via *Bemisia tabaci*. A. Maladie de la mosaïque du Manioc (Cassava Mosaic Disease, *CMD*). B. Maladie des feuilles en cuillère du Gombo (Okra leaf curl disease, *OLCD*). C. Virus des feuilles jaunes en cuillère (Tomato yellow leaf curl virus, *TYLCV*) (Photos Innocent Zinga et Jean Michel Lett, CIRAD).

La durée du cycle de développement de *B. tabaci* est fortement liée à la plante hôte (Muniz 2000; Muniz & Nombela 2001), à la température (Drost *et al.* 1998; Bonato *et al.* 2007; Delatte *et al.* 2009a), ainsi qu'au biotype (Drost *et al.* 1998). *Bemisia tabaci* est une espèce multivoltine, c'est-à-dire pouvant accomplir jusqu'à une quinzaine de générations par an, en présence de conditions climatiques favorables à sa multiplication (Gerling 1990).

I. D. 2. b) Statut invasif et biotypes responsables

Bemisia tabaci est reconnue comme l'une des 100 espèces les plus invasives au monde (Global Invasive Species Database <http://www.issg.org/database/welcome>), principalement pour les dégâts qu'elle occasionne sur les plantes cultivées et ornementales. Ces dégâts sont de deux ordres : directs et indirects. D'une part, les dégâts trophiques directs, liés à la prise de nourriture dans le phloème, sont d'autant plus préjudiciables que les densités numériques sont élevées (Berlinger 1986). D'autre part, l'excrétion de miellat produit par *B. tabaci* et le développement ultérieur de fumagine peut agir indirectement sur son hôte en affectant la fonction photosynthétique et en dépréciant la valeur commerciale des produits récoltés (Byrne & Bellows 1991). Pour importants qu'ils soient sur le plan économique, ces dégâts sont moins graves au regard des maladies virales que peut transmettre cet aleurode (Figure 7). En effet, sur un total de 209 virus transmis par les aleurodes aux plantes cultivées ainsi qu'aux adventices, 191 espèces sont transmises par *B. tabaci* et appartiennent à quatre genres de virus. Les *Begomovirus* sont les virus majoritairement (90%) transmis par *B. tabaci* (Jones 2003b). Certains virus de la famille des *Crinivirus*, des *Ipomovirus* et des *Carlavirus* sont également transmis par *B. tabaci* mais plus rarement (pour exemples : (Muniyappa 1983; Duffus *et al.* 1986; Jones 2003b; Adkins *et al.* 2007)).

Les principaux responsables de ces dégâts ont été identifiés comme les biotypes B et Q. Le biotype B a été reconnu comme responsable du premier événement d'invasion observé à la fin des années 80 (Broadbent *et al.* 1989). À partir de sa région d'origine (Moyen-Orient/ Asie Mineure), le biotype B a envahi une cinquantaine de pays à travers le monde (De Barro *et al.* 2010). Ces dernières années, parallèlement à l'invasion mondiale du biotype B, l'invasion du biotype Q a également été détectée. Il serait originaire de la péninsule ibérique (De la Rua *et al.* 2006) et se serait dispersé vers une dizaine d'autres pays (pour revue : (De Barro *et al.* 2010)).

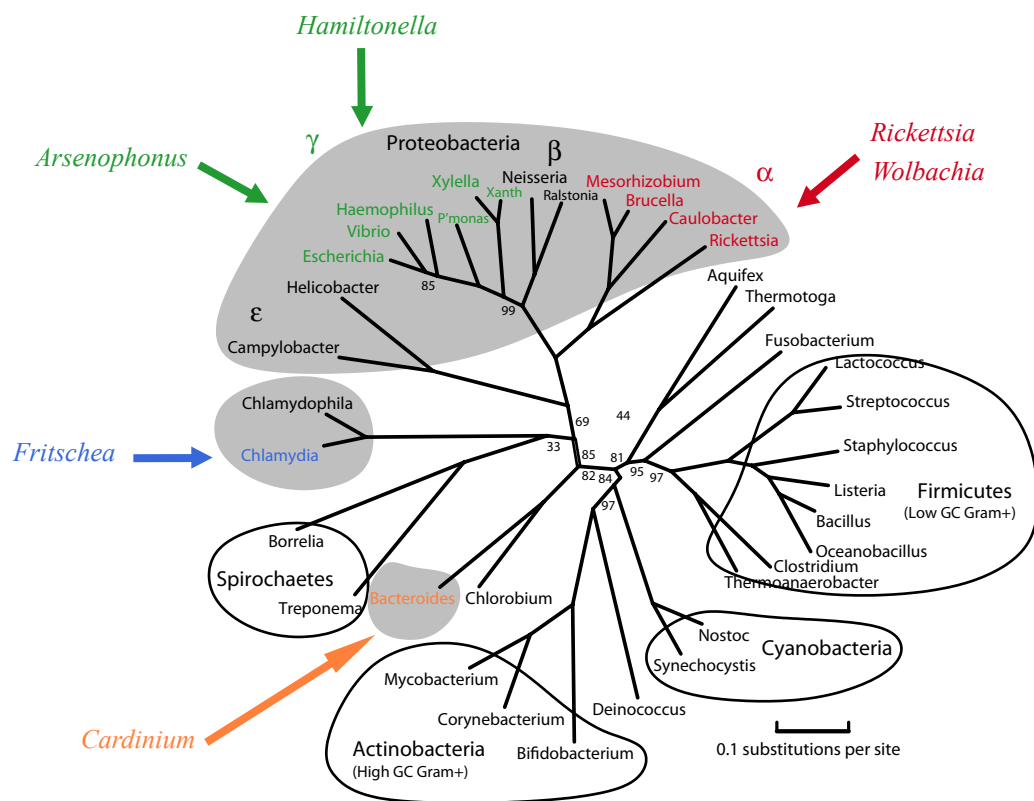


Figure 8. Arbre phylogénétique du règne des *Bacteria* et origine taxonomique des endosymbiotes secondaires de *Bemisia tabaci*. Les endosymbiotes de *B.tabaci* sont distribués dans des groupes de bactéries très diverses. *Hamiltonella* et *Arsenophonus* appartiennent à la classe des *Gammaproteobacteria* (*Proteobacteria*), *Rickettsia* appartient à la classe des *Alphaproteobacteria* (*Proteobacteria*), *Cardinium* appartient au Phylum des *Bacteroidetes* et *Fritschea* au phylum des *Chlamydiae*. Arbre extrait de Bern *et al.* (2005).

I. D. 2. c) Répartition géographique et plantes hôtes

Bemisia tabaci a actuellement une vaste répartition géographique englobant l'ensemble des continents à l'exception de l'Antarctique et de l'Arctique. Sa distribution mondiale actuelle est probablement liée à l'intensification de l'agriculture ainsi qu'à la mondialisation du marché des plantes ornementales (Brown & Bird 1995).

A cette large distribution géographique s'ajoute un spectre d'hôtes impressionnant : plus de 900 espèces végétales appartenant à 74 familles botaniques différentes ont été recensées comme hôtes de *B. tabaci* à travers le monde. Parmi la liste des plantes hôte de *B. tabaci* (Mound & Halsey 1978; Greathead 1986), les familles les plus représentées sont les *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Asteraceae*, *Solanaceae*, *Euphorbiaceae*, *Convolvulaceae* et *Cucurbitaceae*. Cependant la liste des plantes hôtes de *B. tabaci* est loin d'être exhaustive puisque de nombreuses études ont récemment décrit de nouvelles familles de plantes: *Cleomaceae*, *Sterculiaceae*, *Rubiaceae*, *Verbenaceae*, *Valerianaceae* et *Hypericaceae*. (Simmons *et al.* 2000; Oliveira *et al.* 2001).

I. D. 3. Les endosymbiotes chez *Bemisia tabaci*

Bemisia tabaci héberge une extraordinaire diversité d'endosymbiotes avec sept bactéries décrites jusqu'à maintenant, dont un endosymbiote primaire et six endosymbiotes secondaires (Zchori-Fein & Brown 2002; Thao & Baumann 2004). L'endosymbiote primaire obligatoire *Portiera aleyrodidarum* (*Gammaproteobacteria*) synthétise des amino-acides essentiels, éléments nutritifs absents dans la sève élaborée qui constitue la nourriture des aleurodes et indispensables pour la survie de l'hôte (Moran & Baumann 2000; Thao & Baumann 2004). Cette relation privilégiée ainsi que la congruence des phylogénies entre l'hôte et la bactérie révèlent la longue association qui s'est mise en place au cours de l'évolution entre ces deux partenaires (Thao & Baumann 2004). Les six endosymbiotes secondaires sont, quant à eux, additionnels et sont répartis dans différents phylum et classes (Figure 8) : *Cardinium* (*Bacteroidetes*, *Sphingobacteria*), *Wolbachia* (*Proteobacteria*, *Alphaproteobacteria*), *Rickettsia* (*Proteobacteria*, *Alphaproteobacteria*), *Arsenophonus* (*Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria*), *Hamiltonella* (*Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria*) et *Fritschea*

(*Chlamydiae*, *Chlamydiae*). Leur rôle à une échelle individuelle et populationnelle est encore inconnu chez *B. tabaci*.

Les études sur la diversité des endosymbiotes et leur prévalence dans les populations de *B. tabaci* se sont multipliées ces dix dernières années. En effet leurs rôles potentiels dans la structure génétique des populations et leurs implications dans la biologie même de leurs hôtes sont indispensables à comprendre dans le cas d'une espèce invasive. Inévitablement, les études les plus complètes se sont portées sur les biotypes appartenant au clade « invasif ».

I. E. Contexte et objectifs

I. E. 1. Contexte

La Réunion est une île française située dans l'Océan Indien ($21^{\circ}06''S$; $55^{\circ}36''E$), à environ 800 km à l'Est de Madagascar (Figure 9).

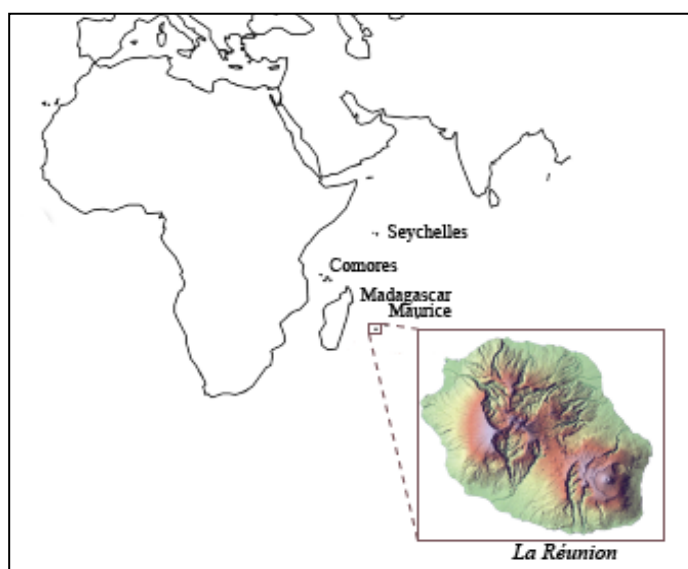


Figure 9. Situation géographique de l'île de La Réunion dans l'Océan Indien.

L'île fait partie de l'archipel des Mascareignes avec les îles Maurice (300 km au Nord Est de La Réunion) et Rodrigues (à 800 km à l'Est). C'est une île volcanique de 2512 km². L'île a émergée de l'océan, il y a environ 2.1 Ma (Deniel *et al.* 1992). Elle est très montagneuse mais la partie émergée ne représenterait que 3% de l'ensemble du « massif ».

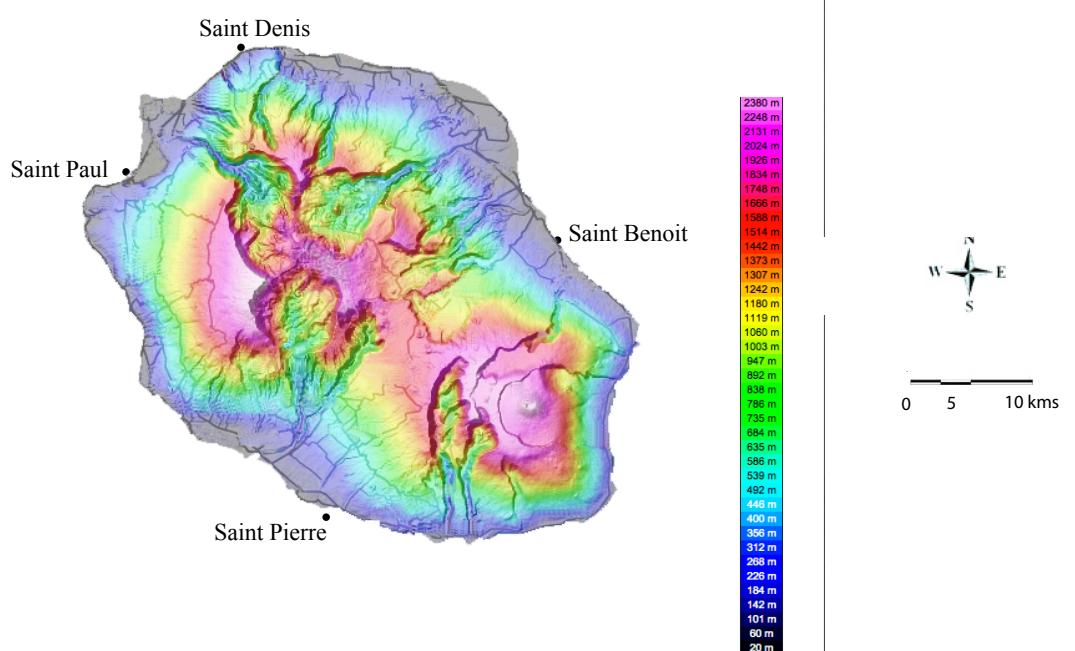
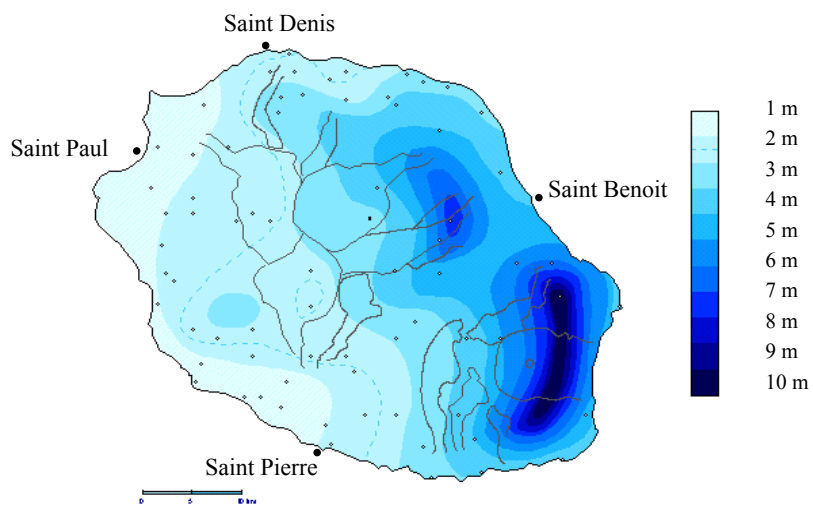
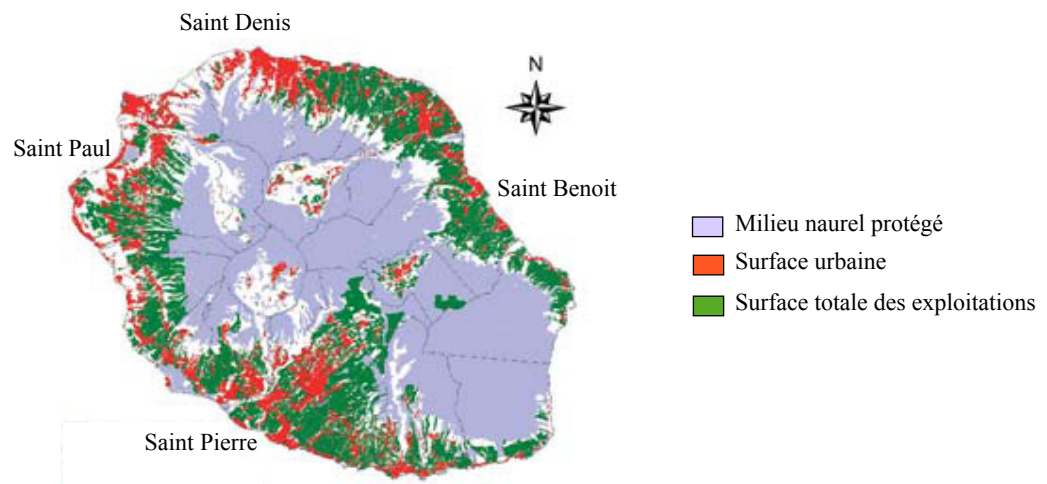


Figure 10. A. Carte de la surface des exploitations agricoles à La Réunion (Direction de l'Agriculture et de la Forêt, 2009). B. Cartes de la pluviométrie moyenne annuelle à La Réunion (Atlas Climatique de La Réunion, 1997). C. Carte de la topographie de La Réunion (<http://www.cartes-topographiques.fr>)

Le point culminant de l'île, le Piton des Neiges (3071 m) est également le plus haut sommet de l'Océan Indien. Cette chaîne de montagne au centre de l'île forme une barrière naturelle aux alizées venant de l'Est ce qui crée 2 sous régions climatiques distinctes. La côte Est ou côte au vent reçoit plus de 70% des précipitations et la pluviométrie annuelle est largement supérieure à 3m (Figure 10). La côte Ouest, appelée côte sous le vent par opposition, est beaucoup plus sèche et la pluviométrie annuelle excède rarement 1m par an. Au-delà de ces grandes régions climatiques il existe une multitude de microclimats liés notamment au relief tourmenté. L'île jouit d'un climat tropical humide formé de 2 saisons majeures : l'hiver austral de mai à octobre où il fait frais et sec, et l'été austral qui est nettement plus chaud et pluvieux de novembre à avril. C'est aussi durant l'été austral que se manifestent la plupart des phénomènes cycloniques.

Le relief escarpé et accidenté du centre de l'île ne laisse finalement qu'une fine bande littorale (appelée « les Bas ») où il fait relativement chaud toute l'année (entre 21°C l'hiver et 26°C l'été) sur laquelle est concentrée la majeure partie de la population. Par opposition « les Hauts » de l'île connaissent des différentiels thermiques et pluviométriques liés à leur localisation géographique.

Du fait de son relief et son volcanisme, La Réunion dispose d'un espace assez réduit. En effet la surface agricole utile (SAU), soit 43692 ha, n'excède pas un cinquième du territoire (Figure 10). Par ailleurs, plus de la moitié de cette SAU présente des pentes supérieures à 20 %. Les exploitations sont généralement de petite taille, 97 % d'entre elles possédant une surface inférieure à 20 ha. Cette SAU s'organise de la façon suivante (Agreste, 2010):

- 75 % de terres arables (canne à sucre : culture la plus importante de l'île avec 25923 ha, cultures légumières : 1611 ha, cultures fruitières semi-permanentes : 564 ha),
- 20 % de surface toujours enherbée,
- 5 % de cultures fruitières permanentes.

Au début de cette thèse, la répartition des biotypes B et Ms avait été documentée lors d'un échantillonnage, sur le pourtour de l'île (Delatte *et al.* 2006).

D'autre part des observations menées en laboratoire montrent que le biotype B possède une capacité de reproduction plus efficace avec des durées de stades larvaires moins importantes et une fécondité supérieure à son homologue Ms (Delatte *et al.* 2009a), ce qui lui confère un avantage sélectif. Ces différences de comportements n'empêchent pourtant pas l'hybridation des deux biotypes puisque, chose inédite dans le monde, un sous-groupe correspondant à des hybrides entre les deux populations a été observé dans différentes localités à plusieurs reprises sur les échantillonnages menés en 2002 et 2006 (Delatte *et al.* 2006).

I. E. 2. Objectifs

Quelle est la dynamique temporelle d'une invasion biologique et comment l'environnement réagit à des introductions ?

Au travers du modèle de *Bemisia tabaci* l'objectif de ce travail de thèse a été d'analyser l'effet et l'évolution de la diversité endosymbiotique et de la ségrégation de l'habitat afin de mieux comprendre la contribution des mécanismes écologiques et génétiques dans la coexistence et l'isolement reproducteur entre des populations indigènes et invasives.

Ces questions sont étudiées à travers le modèle de l'insecte phytophage *B. tabaci* sur l'île de La Réunion. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le milieu insulaire est ici un modèle de choix puisque les événements d'introduction sont facilement détectables et puisque les mécanismes évolutifs sont généralement plus rapides en milieu insulaire.

La première partie traite de la première description d'un biotype nouvellement introduit sur l'île de La Réunion : le biotype Q. Ce biotype, tout comme le biotype B, est invasif dans le monde. Les analyses portent sur la diversité mitochondriale et sur la diversité de la communauté endosymbiotique de ce nouveau biotype. Cette description fait l'objet d'une publication en préparation.

La deuxième partie s'attachera à analyser la diversité de la communauté endosymbiotique dans les populations B, Ms et hybrides de *Bemisia tabaci* en lien avec la diversité génétique de ces populations.

Cette étude permet ainsi de mettre en valeur des mécanismes potentiels d'isolement reproducteur postzygotiques entre les biotypes B, invasif et Ms indigène. Cette étude fait l'objet d'une publication acceptée dans *Molecular Ecology*.

La troisième partie s'attachera à étudier la diversité génétique des endosymbiotes détectés dans les populations naturelles de La Réunion en relation avec la diversité génétique observée chez d'autres biotypes de *B. tabaci* et dans d'autres groupes d'insectes et pouvant donner des indices sur leur rôle dans les populations.

Enfin la dernière partie, porte *i)* sur la dynamique d'évolution de la préférence écologique d'habitat des deux biotypes au cours d'une période de dix ans après l'introduction du biotype B à La Réunion *ii)* sur l'évolution des hybrides entre 2006 et 2010 *ii)* et sur l'évolution des fréquences d'infections endosymbiotiques chez les populations parentales B et Ms. Cette partie permettra de discuter de la dynamique d'évolution de l'isolement reproducteur entre les biotypes B et Ms à travers la mise en place de barrières prézygotiques et postzygotiques.

***Chapitre I. Première description du
biotype Q à la Réunion***

Les populations invasives sont décrites comme des populations introduites ayant un impact négatif sur la biodiversité, les activités humaines ou sur la santé humaine (Lee 2002). Les introductions se sont dramatiquement multipliées avec l'avènement des moyens de transport et la mondialisation des échanges commerciaux (Barbault & Atramentowicz 2010). L'introduction de nouvelles populations dans un milieu insulaire est de première importance, puisqu'elle engendre des interactions avec les populations déjà en place et peuvent participer à la modification de la dynamique de celles-ci (Whittaker 1998).

Bemisia tabaci est un aleurode de la famille des *Aleyrodidae*, reconnu comme l'une des 100 espèces les plus invasives au monde par les dégâts considérables qu'il occasionne sur les cultures agricoles. Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, ces nouvelles introductions perturbent d'autant plus les écosystèmes insulaires de par leur fragilité écologique. L'introduction d'un nouveau biotype dans une région peut impliquer de profonds changements d'une part en termes de gestion agricole sur le territoire nouvellement colonisé, et d'autre part en termes d'interactions avec les biotypes déjà en place.

De nombreux biotypes de *B. tabaci* ont été décrits et deux d'entre eux, les biotypes Q et B sont reconnus comme les plus invasifs dans le monde (Brown *et al.* 1995b; De Barro *et al.* 2010). C'est-à-dire que leur capacité à coloniser un milieu et à s'établir de manière permanente est supérieure à d'autres biotypes. Le biotype B a colonisé La Réunion à la fin des années 90 et s'y est installé de manière pérenne, occasionnant de nombreux dégâts par la transmission d'un virus de la famille des begomovirus, le *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Le biotype Q apparemment originaire de la péninsule Ibérique (De la Rua *et al.* 2006) a colonisé depuis une dizaine d'années le bassin méditerranéen (Brown 2000; Horowitz *et al.* 2003), la Chine (Chu *et al.* 2006), le Japon, Le Mexique, les USA et le Guatemala (cités dans (Brown 2007)) Ce biotype est quant à lui surtout redouté pour sa capacité de résistance à de nombreux insecticides (Horowitz *et al.* 2005).

Chez *B. tabaci*, le remplacement de populations autochtones par l'introduction populations invasives du biotype Q ou du biotype B a été largement montré (pour revue : (De Barro *et al.* 2010)). Les biotypes de *Bemisia tabaci* ne se différencient pas morphologiquement et leur identification taxonomique s'effectue à l'aide marqueurs moléculaires. L'importance des

outils moléculaires dans la détection et la caractérisation taxonomique de nouvelles populations potentiellement invasives est donc essentielle en termes de gestion agricole et en termes d'étude des processus évolutifs qui se mettent en place lors de l'établissement d'une espèce invasive.

Au cours de la campagne d'échantillonnage 2010 pour le suivi des populations de *B. tabaci* sur l'île de La Réunion, une pullulation d'aleurodes fut observée sur un des sites de prélèvement. La dernière pullulation de cette ampleur fut observée lors de l'introduction du biotype B sur l'île (Peterschmitt *et al.* 1999). Les échantillons prélevés ont été analysés à l'aide d'un marqueur mitochondrial (cytochrome oxydase I, *COI*) et à l'aide de la détection de la communauté bactérienne endosymbiotique, spécifiques de certains biotypes. Cette étude révèle l'introduction du biotype Q sur l'île de la Réunion grâce aux données mitochondriales et endosymbiotiques.

**Evidence from mitochondrial and endosymbiotic data of the *Bemisia tabaci*
Q biotype introduction in La Réunion.**

M. Thierry¹, A. Bile¹, M. Grondin¹, B. Reynaud¹ N. Becker², and H. Delatte¹

¹*CIRAD, UMR PVBMT CIRAD-Université de La Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7
chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, Ile de La Réunion, France*

²*MNHN UMR OSEB 7205 (MNHN/CNRS), 75005 Paris, France*

Keywords: COI phylogeny, endosymbionts, first report, whitefly introduction

Corresponding authors:

Magali THIERRY

*CIRAD, UMR PVBMT CIRAD-Université de La Réunion, Pôle de Protection des plantes, 7
chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, Ile de La Réunion, France*

Fax: +262 262499293

E-mail: mag.thierry@cirad.fr

Running title: Introduction of *Bemisia tabaci* Q biotype in La Réunion

Abstract

The whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is a worldwide pest and a vector of numerous plant viruses. *B. tabaci* is composed of dozens of morphologically undistinguishable biotypes, which identification and phylogeny is based on *COI* gene sequences. The composition in maternally transmitted endosymbiotic community is thought to contribute to the mitochondrial diversity of the *B. tabaci* complex. *Bemisia tabaci* harbours a great diversity of these microorganisms: an obligatory primary symbiont *Portiera aleyrodidarum* and six secondary symbionts *Cardinium*, *Rickettsia*, *Hamiltonella*, *Arsenophonus*, *Wolbachia* and *Fritschea*. The B and Q biotypes are recognized as the most invasive and widespread members of the *B. tabaci* complex, with respect to their biological characteristics. Hitherto, the island of La Réunion hosted two biotypes: the exotic B biotype and the Ms biotype, indigenous of the south-west Indian Ocean. A field survey carried out in 2010, revealed an unusual high density of whiteflies. In this study, evidences for the presence of the Q1 and Q2 genetic groups of the invasive Q biotype in La Réunion are drawn from mitochondrial and endosymbiotic data. Results emphasize the importance to biotype identification, together with endosymbiotic community detection, for efficient crop management.

Introduction

Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) is a polyphagous whitefly species distributed throughout tropical and subtropical regions worldwide (Oliveira *et al.* 2001). In the past two decades, *B. tabaci* has become a major problem both as a pest and as a vector of plant viruses, especially viruses included begomoviruses (Jones 2003a). This species has been described since the 1950s as composed of several distinct entities named “biotypes” (Bird & Maramorosch 1978). Biotypes cannot be distinguished morphologically (Brown *et al.* 1995a). Its descriptions were initially based on enzymatic polymorphism, host range, life history traits, dispersal behaviour and on the capacity to transmit plant viruses. The species status of *B. tabaci* is a long-term debate (Xu *et al.* 2010). Most data were obtained on the basis of nuclear ribosomal first internal transcribed spacer (*ITS1*) (De Barro *et al.* 2000) and/or mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) gene partial sequences (Frohlich *et al.* 1999a). More than 20 biotypes have been reviewed in Perring *et al.* (2001) on the basis of these behavioural, ecological and genetical characteristics. Using mitochondrial *COI* gene, Boykin *et al.* (2007) have merged biotypes in 12 genetic groups, and more recently, Dinsdale *et al.* (2010) have proposed to merge biotypes in 24 different cryptic species belonging to 11 major genetic groups, in respect to the percentage of genetic divergence.

The study of the mitochondrial diversity of the *B. tabaci* complex together with the host-endosymbiont community characterisation is thought to give important information for taxonomic identification (Gueguen *et al.* 2010; Stahlhut 2010). *B. tabaci* harbours a great diversity of these microorganisms, including an obligate nutritional endosymbiont *Portiera aleyrodidarum* (Thao & Baumann 2004) and a variety of facultative secondary endosymbionts: *Cardinium*, *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Rickettsia*, *Wolbachia* and *Fritschea* (Zchori-Fein & Brown 2002; Everett *et al.* 2005).

The B and the Q biotypes have been recognized as the most invasive and ubiquitous members of the *B. tabaci* complex (Rossell *et al.* 1997; Chu *et al.* 2006; Boykin *et al.* 2007).

The Q biotype has become a major threat on crops because of its recent and worldwide expansion, its ability to reach high population densities (Moya *et al.* 2001) and of its resistance to many different insecticides (Horowitz *et al.* 2005; Luo *et al.* 2010). The Q biotype, originally thought to be restricted to the Iberian Peninsula, has recently been widely found in the Mediterranean Basin (Horowitz *et al.* 2003; Horowitz *et al.* 2005; Simon *et al.* 2007) and now has been introduced in non-Mediterranean countries such as China (Zhang *et al.* 2005), Japan (Ueda & Brown 2006), Mexico, and the USA (Brown 2007). Based on the

mitochondrial *COI* gene phylogeny and on the endosymbiont community characterisation, three genetic groups were distinguished among this biotype: Q1 that is probably indigenous from the Western Mediterranean countries, Q2 that probably originates from Israel or Cyprus (Chu *et al.* 2008) and the more recently described Q3 genetic group represented by Burkina Faso populations (Gueguen *et al.* 2010).

La Reunion is a French island situated in the Mascarenes archipelago, in the south-western part of the Indian Ocean (700 km east of Madagascar). *Bemisia tabaci* was first described from La Reunion in 1938 (Bourriquet 1938) and later by Luziau (Luziau 1953). The introduction in the late 90's of the world invasive B biotype of *B. tabaci* into the island of La Reunion became a major threat on tomato crops as a vector of *Tomato yellow leaf curl Virus* (Delatte *et al.* 2007). RAPD- PCR and *COI* sequencing on *B. tabaci* populations of this island also revealed the presence of a new biotype, named Ms, indigenous of the south-west of Indian Ocean (Delatte *et al.* 2005; Delatte *et al.* *In Press*).

A field survey on *B. tabaci* dynamic carried out in January 2010, revealed an unusual high density of *B. tabaci* on eggplant crops. Mitochondrial diversity and endosymbiotic community composition were analysed. According to our data, we provided evidence for the presence of the Q1 and Q2 genetic groups of the invasive Q biotype, detected in La Réunion for the first time.

Table 1. Samples used in this study for mitochondrial analysis and endosymbionts detection.

Sample code	GenBank accession no.	Location	Biotype	Genetic group	Reference
	AJ877260	La Reunion	B	Middle East-Asia Minor 1	Delatte et al., 2006
	EU760719	Israel	B	Middle East-Asia Minor 2	Delatte et al., 2006
	EU760735	La Reunion	Ms	Indian Ocean	Gueguen et al., 2010
	AJ550171	La Reunion	Ms	Indian Ocean	Delatte et al., 2006
	EU760744	Morocco	Q	Mediterranean Basin Q1	Gueguen et al., 2010
	EU760743	France	Q	Mediterranean Basin Q1	Gueguen et al., 2010
	EU760753	Morocco	Q	Mediterranean Basin Q1	Gueguen et al., 2010
	EU760746	France	Q	Mediterranean Basin Q1	Gueguen et al., 2010
	EU760736	Tunisia	Q	Mediterranean Basin Q1	Gueguen et al., 2010
SPAubF2HC		La Reunion	Q	Mediterranean Basin Q1	this study
SPAubF3HC		La Reunion	Q	Mediterranean Basin Q1	this study
SPAubF5HC		La Reunion	Q	Mediterranean Basin Q1	this study
SPAubF6HC		La Reunion	Q	Mediterranean Basin Q1	this study
SPAubF9HC		La Reunion	Q	Mediterranean Basin Q1	this study
SPAubF11HC		La Reunion	Q	Mediterranean Basin Q1	this study
SPAubF73HC		La Reunion	Q	Mediterranean Basin Q1	this study
SPAubF74HC		La Reunion	Q	Mediterranean Basin Q1	this study
SPAubF75HC		La Reunion	Q	Mediterranean Basin Q1	this study
SPAubF77HC		La Reunion	Q	Mediterranean Basin Q1	this study
SPAubF76HC		La Reunion	Q	Mediterranean Basin Q1	this study
	EU760756	Israel	Q	Middle eastern Q2	Gueguen et al., 2010
SPAubF8RWA		La Reunion	Q	Middle eastern Q2	this study
SPAubF12RWA		La Reunion	Q	Middle eastern Q2	this study
SPAubF29RWA		La Reunion	Q	Middle eastern Q2	this study
SPAubF52RWA		La Reunion	Q	Middle eastern Q2	this study
SPAubF60RWA		La Reunion	Q	Middle eastern Q2	this study
SPAubF7RWA		La Reunion	Q	Middle eastern Q2	this study
SPAubF10RWA		La Reunion	Q	Middle eastern Q2	this study
SPAubF51RWA		La Reunion	Q	Middle eastern Q2	this study
SPAubF8RWA		La Reunion	Q	Middle eastern Q2	this study
	FJ766424	Burkina Faso	Q	Burkina Faso Q3	Gueguen et al., 2010
	FJ766431	Burkina Faso	Q	Burkina Faso Q3	Gueguen et al., 2010
	FJ766429	Burkina Faso	Q	Burkina Faso Q3	Gueguen et al., 2010

Material and method

Whiteflies collection and DNA extraction

During a field survey of *B. tabaci* populations in La Réunion in January 2010, an unusual proliferation of whiteflies in the locality of Saint Pierre (Fig. 1) was found on eggplant crop. Whiteflies were collected and stored in 95% ethanol. Each field-captured insect was sexed before DNA extraction as described in (Delatte *et al.* 2005).

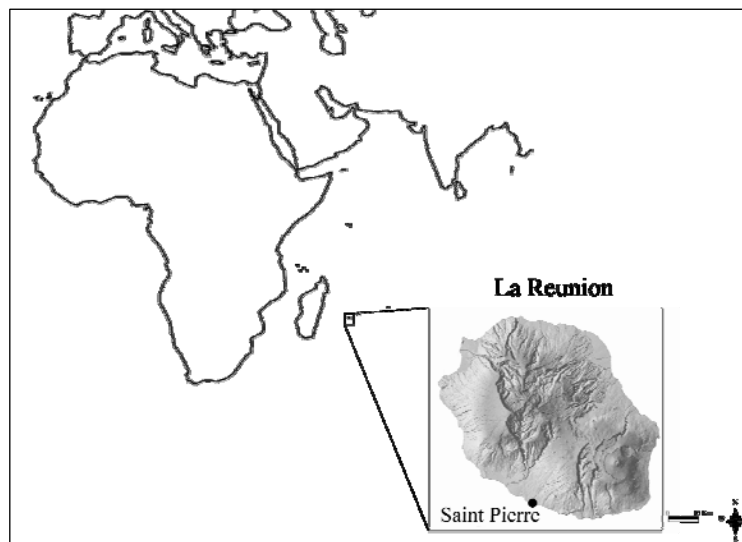


Figure 1. Localisation of La Réunion in the south-west of Indian Ocean. Samples were collected in Saint Pierre where we found exclusively individuals from the Q1 and Q2 genetic group.

Mitochondrial amplification and phylogenetic analysis

To identify the whitefly biotype, 20 individuals among the ones collected from Saint Pierre on eggplant were chosen for mitochondrial sequencing. Mitochondrial *COI* gene sequences were obtained by PCR amplification with the primer set COI-F-C1 and COI-R-C1 as described in (Thierry *et al.* *In Press*). Thirteen others *B. tabaci* *COI* sequences were obtained from public sequence databases using Tax browser and BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Table 1). Multiple sequence alignments were constructed using the CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) based subalignment tool available in MEGA version 4 (Tamura *et al.* 2007) and by manual editing. The optimal model of sequence evolution and the maximum likelihood (ML) tree were estimated with PHYML (Guindon *et al.* 2005) available in RDP3

Table 2. Nucleotide sequence of primers used in this study

Gene and organism	Primer set sequences (5'→3')	Length (bp)	Reference
<i>16S, Rickettsia</i> Rb-F/Rb-R	GCTCAGAACGAACGCTATC GAAGGAAAGCATCTCTGC-NED	~900	Gottlieb <i>et al.</i> , 2006
<i>16S, Hamiltonella</i> Hb-F/Hb-R	TGAGTAAAGTCTGGGAATCTGG AGTTCAAGACCGCAACCTC-VIC	~750	Zchori-Fein <i>et al.</i> , 2002
<i>wsp, Wolbachia</i> 81-F/598-R	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC AAAAATTAAACGCTACTCCA-NED	~600	Braig <i>et al.</i> , 1998
<i>23S, Arsenophonus</i> Ars-23S1/Ars-23S2	CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA GGTCCTCCAGTTAGTGTTACCCAAC-PET	~600	Thao & Baumann, 2004
<i>16S, Cardinium</i> CFB-F/CFB-R	GCGGTGTAAAATGAGCGTG ACCTMTTCTTAACTCAAGCCT-FAM	~450	Weeks <i>et al.</i> , 2003
<i>16S, Portiera</i> Port-F/Port-R	GGAAACGTACGCTAATAC TGACGACAGCCATGCAGCAC	~900	Thierry <i>et al.</i> , In press
<i>COI, B. tabaci</i> COI-F-C1/ COI-R-C1	CATCTAATCAGCAGTGAGGCTGG AAAAGTTAAATTTACTCCAAT	~450	Weeks <i>et al.</i> , 2003

All primer sets (except *16S, Portiera* and *COI, B. tabaci*) were used in a multiplex PCR (reverse primers were labelled with the fluorochromes NED, VIC, PET or 6-FAM). *16 S, Portiera* primers were used to check symbiont DNA extraction quality. *COI* primers were used for mitochondrial analysis of *B. tabaci*.

(Martin *et al.* 2010). Nodes supported for the ML tree were estimated with 500 bootstrap replicates.

Endosymbiotic community detection

The endosymbiotic infection status was assessed for the twenty individuals identified by sequences of the mitochondrial *COI* gene. We first checked the quality of the bacterial DNA extraction, using primers targeting the *16S* rDNA of the obligatory primary endosymbiont *P. aleyrodidarum*. The endosymbiotic community was detected using a multiplex PCR developed by Thierry *et al.* (*In Press*) including primers targeting the *16S* rDNA for the detection of *Cardinium*, *Rickettsia*, *Hamiltonella*, targeting the *23S* rDNA for *Arsenophonus*, and targeting the *wsp* gene for *Wolbachia* (Table 2).

Results

Mitochondrial analysis

The best model of nucleotide substitution chosen by RDP3 program to reconstruct the phylogeny on the *COI* gene tested was TN93+G. Five different genetic groups could be drawn from this tree (Fig.2): the Middle East-Asia Minor B genetic group, the Indian Ocean Ms genetic group, and the Mediterranean Q genetic group which include Q1, Q2 and Q3 populations.

Sequences obtained from the 20 individuals of Saint Pierre revealed the presence of three new and different haplotypes, never described in La Réunion. The two first haplotypes belonged to the Q1 *B. tabaci* genetic group. The first haplotype comprised eight sequences and belonged to a clade supported at 60% with closest sequences from France (EU760743) and Morocco (EU760753) and EU760744). The second haplotype comprises sequences clustered with an isolate from France (EU760746) and one from Tunisia (EU760736). The third haplotype comprises sequences belonging to the Q2 *B. tabaci* genetic group comprising a sequence from Israel (EU760756).

Endosymbiotic community composition

We found three different endosymbiont assemblages never described before in La Réunion. Individuals from Q1 genetic group are all infected with both *Hamiltonella* and *Cardinium*

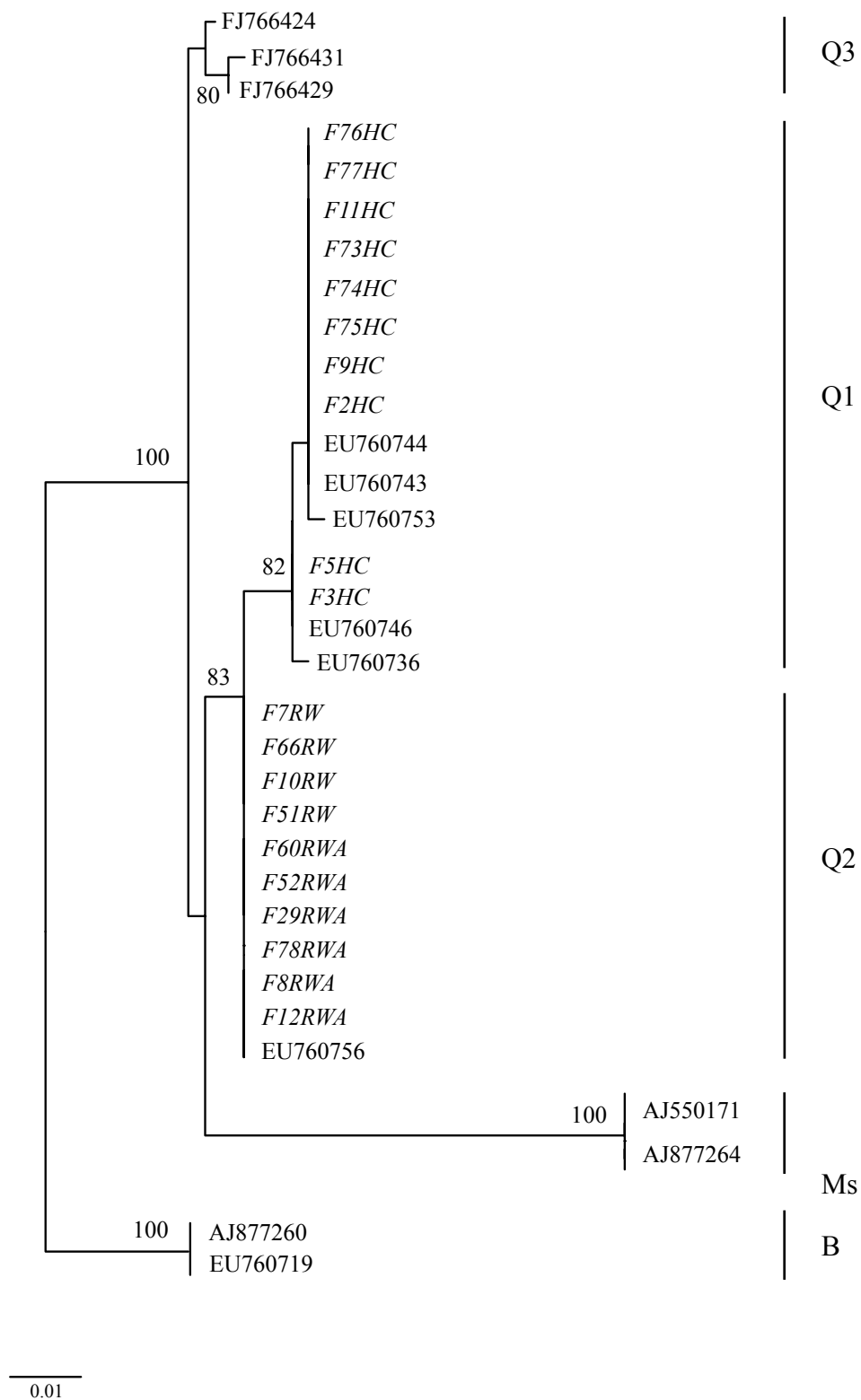


Figure 2. Phylogeny of *Bemisia tabaci* based on 450 pb of COI gene. Phylogenetic tree was constructed with by maximum-likelihood analysis under a TN93 substitution model using PhyML program. Bootstrap values were computed with 500 replicates and only bootstraps above 60 are indicated. Sequences in italic were produced in this study.

without distinction between the two haplotypes (Fig.1). Q2 genetic group individuals revealed two different assemblages. Half were infected with both *Rickettsia* and *Wolbachia* and half were infected with the three *Rickettsia*, *Wolbachia* and *Arsenophonus*. These different combinations associated with particular genetic groups of the Q biotype are in accordance with the previous study of (Gueguen *et al.* 2010). Indeed, they found *Hamiltonella* and *Cardinium* (in co occurrence or not) in populations of the Q1 *B. tabaci* genetic group of France, Uruguay, Morocco and Sudan and *Rickettsia*, *Wolbachia* and sometimes *Arsenophonus* (in co occurrence or not) in populations of the Q2 *B. tabaci* genetic group of Israel.

Discussion

This study reports for the first time the presence of the Q biotype in La Réunion. We found that both Q1 and Q2 genetic groups were introduced. Individuals from the Q1 genetic group harbour *Hamiltonella* and *Cardinium* and individuals from Q2 biotypes harbour *Rickettsia*, *Wolbachia* and *Arsenophonus* as previously described before in the literature (Gueguen *et al.* 2010). First, studies suggest that, in the B and Q biotypes, bacterial endosymbionts harboured by *B. tabaci* significantly influence its susceptibility to certain insecticides, with respect to the presence of *Rickettsia* in the biotypes B and Q (probably Q2 genetic group) (Kontsedalov *et al.* 2008; Ghanim& Kontsedalov 2009). The B biotype has higher fecundity and competitiveness than the Q biotype (Pascual 2006) and the Q biotype (probably Q1 biotype) has a strong ability of resistance to neonicotinoid insecticides (Horowitz *et al.* 2005; Luo *et al.* 2010) and an advantage on certain hosts (Muniz 2000; Muniz& Nombela 2001). The expansion of the Q biotype in China has been extensively followed and (Chu *et al.* 2010) showed the displacement of the B biotype by the newly established Q biotype.

Hence, the coexistence of the invasive B biotype and both Q1 and Q2 genetic groups of the invasive Q biotypes in La Réunion has important implications for crops management. Their different biological characteristics, genetic diversity and endosymbiotic community raise the importance of a solid survey on these populations in the future.

Chapitre II. Diversité symbiotique et hybridation non-aléatoire

A la fin des années 90 à La Réunion, l'étude de *Bemisia tabaci* avait suscité un grand intérêt de par l'introduction du biotype invasif B sur l'île de La Réunion associé à la première détection du *Tomato yellow leaf curl virus*, bégomovirus transmis aux plantes maraîchères par cet aleurode et causant des dégâts considérables sur les cultures de tomates à La Réunion (Reynaud *et al.* 2003; Delatte *et al.* 2007). Une première étude basée sur des analyses par PCR-RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) et par séquençage du gène *COI* (Cytochrome oxydase I) avaient révélé la présence du biotype B invasif dans le monde et d'un biotype indigène nommé Ms (Delatte *et al.* 2005). L'analyse moléculaire de la structuration génétique des populations sauvages, à l'aide huit marqueurs microsatellites, avait par la suite permis de détecter la présence d'hybrides entre ces deux biotypes par des introgressions asymétriques (Delatte *et al.* 2006).

Le succès et la rapidité d'une invasion impliquant des hybridations dépend de la force relative des mécanismes d'isolement reproducteur entre les populations autochtones et allochtones (Blum *et al.* 2010). De plus les mécanismes d'isolement prézygotiques et postzygotiques peuvent tous les deux entraver ou appuyer la formation et la persistance d'hybrides (Coyne & Orr 2004).

Depuis ces dix dernières années, l'intérêt pour les bactéries endosymbiotiques chez les insectes a pris tout son essor de par leur prévalence dans les groupes d'insectes, et de par leur rôle dans la biologie, l'écologie, l'évolution et l'isolement reproducteur des populations d'hôtes (Engelstadter & Hurst 2009; Oliver *et al.* 2010).

B. tabaci n'est pas une exception, et l'extraordinaire diversité de ces bactéries endosymbiotiques détectée dans les populations a suscité depuis ces dernières années un grand intérêt pour leur potentielle implication dans la biologie et l'évolution de ce complexe d'espèces cryptiques. Outre le symbiote obligatoire *Portiera aleyrodidarum*, six symbiotes secondaires ont été décrit (Zchori-Fein & Brown 2002; Everett *et al.* 2005): *Cardinium* (*Bacteroidetes*, *Sphingobacteria*), *Wolbachia* (*Proteobacteria*, *Alphaproteobacteria*), *Rickettsia* (*Proteobacteria*, *Alphaproteobacteria*), *Arsenophonus* (*Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria*), *Hamiltonella* (*Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria*) et *Fritschea* (*Chlamydiae*, *Chlamydiae*).

Dans ce contexte, ce chapitre aborde plusieurs questions. Comment la structure génétique des populations B, Ms et hybride de *B. tabaci* à La Réunion a-t-elle évolué cinq ans après la première étude moléculaire de ces populations ? Quelle est la diversité de la communauté

symbiotique dans les populations B, Ms et hybrides de *B. tabaci* à La Réunion ? Dans le cas de la persistance de la population hybride, celle-ci peut-elle nous donner des informations sur les associations entre les biotypes B et Ms et la présence de barrières postzygotiques ? Les symbiotes secondaires présents dans nos populations contribuent-ils à la présence potentielle de barrières postzygotiques ?

Enfin à l'aide de l'ensemble de ces données, nous avons cherché à savoir :

- Si la différenciation génétique des hybrides était liée aux endosymbiotes ou aux plantes hôtes
- Si les croisements B x Ms, à l'origine des hybrides observés, étaient aléatoires
- S'il existait des déséquilibres nucléo-cytoplasmiques au sein des hybrides observés, en fonction des allèles et des symbiotypes parentaux.

Pour la première fois, la diversité de la communauté endosymbiotique, la diversité génétique nucléaire et mitochondriale ainsi que les plantes hôtes de *B. tabaci* ont été décrites sur l'île de La Réunion pour les biotypes B, Ms et leurs hybrides. Cette étude montre l'association entre les différentes combinaisons symbiotiques et les différents biotypes. Le biotype Ms héberge *Cardinium*, *Arsenophonus*, et une minorité de *Rickettsia*. Le biotype B héberge exclusivement *Hamiltonella* et *Rickettsia*. Au sein des hybrides, la différenciation génétique est liée à leur symbiotype. Ils hébergent toutes les combinaisons symbiotiques décrites chez les biotypes B et Ms. Cependant, les prévalences observées sont différentes de celles qui sont attendues dans le cas d'hybridations aléatoires. Nous avons pu caractériser ces hybridations non-aléatoires par la probable existence d'un déséquilibre nucléo-cytoplasmique entre la bactérie *Arsenophonus* et certains allèles typiques du biotype B chez les hybrides.

**Symbiont diversity and non-random hybridisation among indigenous (Ms)
and invasive (B) biotypes of *Bemisia tabaci***

(Accepté dans Molecular Ecology avec révisions mineures)

M. Thierry¹, N. Becker², A. Hajri¹, B. Reynaud¹, J.-M. Lett¹ and H. Delatte^{1*}

¹*CIRAD, UMR PVBMT CIRAD-Université de La Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7
chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, Ile de La Réunion, France*

²*UMR OSEB 7205 (MNHN/CNRS), Département de Systématique et Evolution, Museum
National d'Histoire Naturelle, 75005 Paris, France*

Keywords: *Bemisia tabaci*, biotypes, hybridisation, microsatellites, secondary symbionts,
mitochondrial DNA.

***Corresponding author:**

Hélène DELATTE

*CIRAD, UMR PVBMT CIRAD-Université de La Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7
chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, Ile de La Réunion, France*

Fax: +262 262499293

E-mail: helene.delatte@cirad.fr

Running title: Symbionts of hybridising *B. tabaci* biotypes.

Abstract

The whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is a worldwide pest and a vector of numerous plant viruses. *B. tabaci* is composed of dozens of morphologically undistinguishable biotypes and considered as a cryptic species, with its taxonomic status still controversial. *B. tabaci* is a phloem-feeder that harbours a primary obligatory symbiont *Portiera aleyrodidarum* and potentially, six secondary symbionts: *Cardinium*, *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Rickettsia*, *Wolbachia* and *Fritschea*. In the South West Indian Ocean, La Réunion hosts two biotypes of this species: B (invasive) and Ms (indigenous of the area). A multiplex PCR was developed to study symbiont community. Symbiont community prevalence and composition, host mitochondrial and nuclear genetic diversity, as well as host plant and localisation, were described on field populations of La Réunion for B, Ms *B. tabaci* biotypes and their hybrids. *Cardinium*, *Arsenophonus* and a minority of *Rickettsia* were found in the Ms biotype. *Hamiltonella* (exclusively) and *Rickettsia* (almost exclusively) were found in the B biotype. In the hybrids only, genetic diversity was found partially linked to symbiotype. Hybrids harboured all symbiont combinations found in Ms and B populations, but with different prevalence than those expected under random hybridisation. An unexpected majority harboured *Cardinium* in mono-infection, and a striking minority harboured *Cardinium*/*Arsenophonus*. Among the hybrids, significant links could be found between symbiont combinations and : *i*) mitochondrial *COI* sequences, *i.e.* maternal origin; *ii*) alleles of nuclear microsatellite loci, specific to either Ms or B parental biotype. The described associations between symbionts and nuclear alleles suggest eventual nucleo-cytoplasmic interactions, involved in *Arsenophonus* maintenance and/or exclusion in a hybrid genetic background.

Introduction

Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) is a polyphagous whitefly species distributed throughout tropical and subtropical regions worldwide (Oliveira *et al.* 2001). *B. tabaci* is a haplo-diploid species, with haploid males (n chromosomes) and diploid females ($2n$ chromosomes). In the past two decades, *B. tabaci* has become a major problem both as a pest and as a vector of plant viruses, especially begomoviruses (Jones 2003a; Varma& Malathi 2003). This species has been described since the 1950s as composed of several distinct entities named “biotypes” (Bird& Maramorosch 1978). Biotypes cannot be distinguished morphologically (Brown *et al.* 1995a). The term biotype is used to designate populations that lack morphological distinction, but that possess other characteristics which serve to separate them from other populations (Claridge *et al.* 1997). The species status of *B. tabaci* is a long term debate (Xu *et al.* 2010). Its descriptions were initially based on enzymatic polymorphism, host range, life history traits, dispersal behaviour and on the capacity to transmit plant viruses. Based on non-specific esterase bands, more than 20 biotypes have been reviewed in Perring *et al.* (2001). More recently, partial sequences were used, *i.e.* nuclear ribosomal first internal transcribed spacer (ITS1) (De Barro *et al.* 2000) and/or mitochondrial *cytochrome c oxidase subunit I* (*COI*) (Frohlich *et al.* 1999a). Based on *COI* partial sequences, Dinsdale *et al.* (2010) defined 24 different cryptic species ($> 3.5\%$ sequence divergence). Although no straightforward correspondence could be made between the 24 cryptic species and 28 analysed biotypes, some clear assignments could be made (see below).

The introduction in the late 90’s of the world invasive B biotype of *B. tabaci* into the island of La Réunion (South West Indian Ocean) became a major threat on tomato crops as a vector of *Tomato yellow leaf curl Virus* (Delatte *et al.* 2007). Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and partial *COI* sequencing on *B. tabaci* revealed the presence of a new biotype, named Ms, indigenous of the South West Indian Ocean (Delatte *et al.* 2005). This new biotype, as well as the B biotype, are assigned to two distinct cryptic species in Dinsdale *et al.* (2010). The genetic diversity of individuals collected in 2001 of these two biotypes was studied with microsatellite markers. Interestingly, for the first time, wild hybrids between two distinct biotypes (B and Ms) were described (Delatte *et al.* 2006).

In the last decade, the biology and molecular analysis of resident microorganisms (symbionts) in insects has provided a powerful explanation of host ecology and evolution (Engelstadter& Hurst 2009; Oliver *et al.* 2010). The occurrence of symbionts among

arthropods is a common feature. It is estimated that up to 10% of all insects are obligatorily associated with symbiotic microorganisms (Wernegreen 2002), and it is likely that their capacity to engage microbial companions has greatly contributed to their evolutionary success (Feldhaar & Gross 2009).

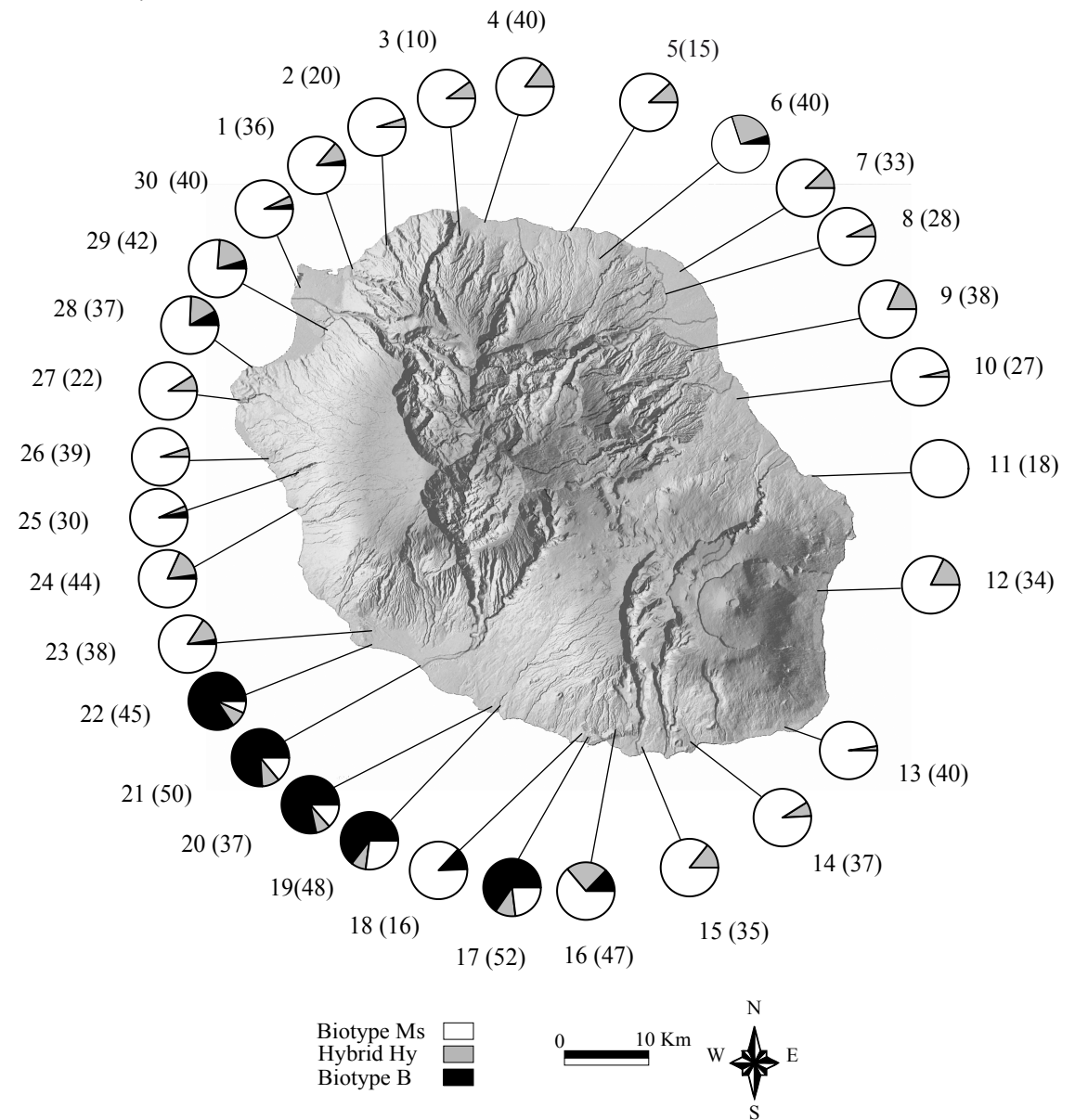
B. tabaci, a phloem-feeder, harbours an obligatory symbiont *Portiera aleyrodidarum*. Maternally and vertically transmitted, this symbiont synthesizes essential amino-acids lacking in phloem (Thao & Baumann 2004). *B. tabaci* also harbours a variety of facultative secondary symbionts: *Cardinium*, *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Rickettsia*, *Wolbachia* and *Fritschea*, (Everett *et al.* 2005; Chiel *et al.* 2007; Gottlieb *et al.* 2008). Their role in *B. tabaci* is however largely unknown. Different symbiotic combinations have been described in the field, mainly according to biotypes (Chiel *et al.* 2007; Gueguen *et al.* 2010; Skaljic *et al.* 2010). Here we address the question of the symbiont distribution in *B. tabaci* of La Réunion, together with the population genetic structure and host plant/localisation of *B. tabaci*.

This study was investigated nearly a decade after the described biotype B invasion in La Réunion (Peterschmitt *et al.* 1999). On 2001-2002 samplings, significant variations in the proportion of biotype B relative to Ms were described, according to sampling sites (Delatte *et al.* 2006); sites were thus collected again throughout the whole island of La Réunion. We analysed host-plant, localisation, microsatellite, mitochondrial and symbiotic data of field *B. tabaci* Ms and B biotypes, as well as the formerly described hybrid population (Delatte *et al.* 2006). Relationships between host plants, localisation, nuclear/mitochondrial genetic data, as well as symbiont combinations were studied for two distinct *B. tabaci* populations and their hybrids from the field.

A.

Geographic zone and sample localisation	Host plant	<i>B. tabaci</i> populations		
		B	Hy	Ms
<i>North</i>				
1. Sainte Thérèse	Annual poinsettia	1	1	27
	Bean	0	3	4
2. La Grande Chaloupe	Annual poinsettia	0	1	19
3. Saint Francois	Annual poinsettia	0	1	9
4. La Bretagne	Annual poinsettia	0	6	34
5. Sainte Marie	Annual poinsettia	0	2	15
6. Bagatelle	Annual poinsettia	2	10	28
<i>East</i>				
7. Cambuston	Annual poinsettia	0	4	29
8. Bras des Chevrettes	Annual poinsettia	0	2	26
9. Bourbier	Annual poinsettia	0	1	15
	Sweet potato	0	6	16
10. Chemin de Ceinture	Annual poinsettia	0	1	19
	Sweet potato	0	0	7
11. Sainte Rose	Annual poinsettia	0	0	18
12. Grand Brûlé	Annual poinsettia	0	6	28
<i>South</i>				
13. Saint Philippe	Annual poinsettia	0	1	39
14. Vincendo	Annual poinsettia	0	3	34
15. Matouta	Annual poinsettia	0	5	30
16. Manapany	Annual poinsettia	3	9	21
	Tomato	3	2	9
17. Petite Ile	Annual poinsettia	2	4	9
	Eggplant	19	2	0
	Tomato	13	0	3
18. Mont Vers les Bas	Annual poinsettia	2	0	14
19. Bassin Martin	Annual poinsettia	2	2	8
	Eggplant	11	0	1
	Tomato	18	2	4
20. Saint Pierre	Annual poinsettia	29	3	5
21. Saint Louis	Annual poinsettia	19	4	6
	Zucchini	18	1	1
	Tomato	1	0	0
<i>West</i>				
22. Etang Salé	Eggplant	35	3	1
	Tomato	3	1	2
23. Ravine Sèche	Annual poinsettia	1	5	32
24. Cap Lelièvre	Annual poinsettia	1	4	23
	Tomato	0	3	13
25. Colimacon	Annual poinsettia	1	0	11
	Poinsettia	0	1	17
26. Souris chaude	Lantana	0	2	37
27. Saint Gilles	Annual poinsettia	0	2	19
	Tomato	0	0	1
28. Saint Paul	Garden spurge	3	6	28
29. Bois de Nèfles	Annual poinsettia	2	8	32
30. Lycée agricole	Annual poinsettia	1	1	34
	Tomato	0	1	3
<i>Total</i>		<i>190</i>	<i>119</i>	<i>731</i>

B.

Figure 1. *Bemisia tabaci* sampling and global repartition of populations on Réunion Island

A. Sample size from each geographic region and from each cultivated plant (bean, tomato, sweet potato, eggplant, zucchini, poinsettia) and weed plant (annual poinsettia, lantana, garden spurge).

B. Repartition of B and Ms biotypes and hybrid (Hy) population on the island of La Réunion. Each site is numbered as referred in table A. Number of individuals sampled in each site are between brackets.

Materials and methods

Whiteflies sampling

Adults of *Bemisia tabaci* were collected in April 2006 on 30 locations over La Réunion on nine different host plants (Fig. 1), stored in 95% ethanol at -20°C. With the aid of a binocular (40 x) stereomicroscope, adults were morphologically sexed as in Calvert *et al.* (2001) before DNA extraction. Host plants included weeds: annual poinsettia (*Euphorbia heterophylla*), garden spurge (*Euphorbia hirta*), lantana (*Lantana camara*), and cultivated plants: poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*), tomato (*Lycopersicon esculentum*), eggplant (*Solanum melongena*), sweet potato (*Ipomea batatas*), zucchini (*Cucurbita pepo*) and bean (*Vigna sp.*).

DNA extraction

Each field-captured whitefly was ground twice with a mixer mill (TissueLyser II, Qiagen) using 4 mm glass beads (Merck) for 2 min at 30Hz, in 25 µl extraction buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-base (pH 8), 0.45% IGEPAL® CA-630, 0.45% Tween® 20 and 500 µg/ml proteinase K (Sigma)). The lysate was incubated at 65°C for 1 h and at 95°C for 10 min. Extracts were briefly centrifuged between each step. A volume of 35 µl of pure HPLC water (CHROMASOLV®, Sigma-Aldrich) was added, and extracts were stored at -20°C until use.

Nuclear and mitochondrial diversity

Microsatellite amplification and genotyping

A total of 1040 adults of *Bemisia tabaci* was genotyped using ten previously described microsatellites loci: P7, P62, P53, P41, P32, P5, P11, P59, Bem25 and Ms145 (De Barro 2005; Delatte *et al.* 2006; Dalmon *et al.* 2008). The equivalent of 10 ng genomic DNA was used for amplification with the QIAGEN multiplex PCR Master Mix kit according to the manufacturer's instructions in a final volume of 15µl. One of each pair of primers was fluorescently end-labelled with the fluorochromes NED, VIC, PET or FAM. Two primer mixes were used in a 15 µl volume: (i) P7, P62, P53, P41, P32, Bem25 and (ii) P5, P11, P59,

Ms145 at a final concentration of 400 nM each. The program used was a first step of denaturation at 94°C for 5 min followed by 40 cycles at 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, 72°C for 1 min, with a final elongation step for 10 min at 72°C. 2 µL of the 1/100e diluted PCR products were mixed with 10.7 µL of ultra-pure Hi-Di-formamideTM (Applied Biosystems) and 0.3 µL of size marker (GeneScan 500Liz®), and loaded onto an ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) automated sequencer. Allele sizes were determined using Genemapper® v4.0.

Microsatellite and genetic diversity analyses

Due to their diploid state, only females were used for the genetic diversity analyses (unless otherwise stated). To differentiate between B and Ms biotypes and the hybrids, we used the Bayesian clustering program STRUCTURE version 2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000). This software differentiates mixed populations on the basis of allele frequency at each locus. The number of individuals and allele frequencies in each cluster, as well as individual assignments, are outputs of the analysis. In order to determine the optimal number of populations (K) of our sample, STRUCTURE was run for K ranging from 1 to 10 (each K was run 5 times). The method of Evanno *et al.* (2005) was used to find the uppermost level of structure in the data set. The optimal K turned out to be K=2. The software was then run twice, with and without the option admixture, which allows for some mixed ancestry within individuals.

To use STRUCTURE, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and linkage equilibrium are assumed within each group. Both hypotheses were tested *a posteriori* on each cluster using exact tests implemented in Genepop 4.0 (Rousset 2008). Some assumptions of STRUCTURE, such as HWE and linkage equilibrium, are potentially violated by parthenogenetic reproduction. We also conducted another clustering method that does not make these assumptions: a principal components analysis (PCA) of allele frequencies. Using R software (R Development Core Team 2009) package adegenet (Jombart 2008), we visualized the position of the groups and individuals defined by the STRUCTURE software along the axes of genetic variation.

Micro-Checker v.2.2.3 software (Van Oosterhout *et al.* 2004) was used to check loci for scoring errors due to stuttering or large allele dropout. To estimate null alleles, which could bias genetic diversity studies, we directly calculated haploid null allele frequencies for

Table 1. Nucleotide sequence of primers used in this study

Gene and organism	Primer set sequences (5'→3')	Length (bp)	Reference
<i>16S, Rickettsia</i> Rb-F/Rb-R	GCTCAGAACGAACGCTATC GAAGGAAAGCATCTCTGC-NED	~900	(Gottlieb <i>et al.</i> 2006)
<i>16S, Hamiltonella</i> Hb-F/Hb-R	TGAGTAAAGTCTGGGAATCTGG AGTTCAAGACCGCAACCTC-VIC	~750	(Zchori-Fein & Brown 2002)
<i>wsp, Wolbachia</i> 81-F/598-R	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC AAAAATTAAACGCTACTCCA-NED	~600	(Braig <i>et al.</i> 1998)
<i>23S, Arsenophonus</i> Ars-23S1/Ars-23S2	CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA GGTCCTCCAGTTAGTGTTACCCAAC-PET	~600	(Thao & Baumann 2004)
<i>16S, Cardinium</i> CFB-F/CFB-R	GCGGTGTAAAATGAGCGTG ACCTMTTCTTAACTCAAGCCT-FAM	~450	(Weeks <i>et al.</i> 2003)
<i>16S, Portiera</i> Port-F/Port-R	GGAAACGTACGCTAATAC TGACGACAGCCATGCAGCAC	~900	This study
<i>COI, B. tabaci</i> COI-F-C1/ COI-R-C1	CATCTAATCAGCAGTGAGGCTGG AAAAGTTAAATTTACTCCAAT	~450	(Weeks <i>et al.</i> 2003)

All primer sets (except *16S, Portiera* and *COI, B. tabaci*) were used in a multiplex PCR (reverse primers were labelled with the fluorochromes NED, VIC, PET or 6-FAM). *16 S, Portiera* primers were used to check symbiont DNA extraction quality. *COI* primers were used for mitochondrial analysis of *B. tabaci*.

each locus from haploid males (41 B biotypes, 45 hybrids, 167 Ms biotypes). Null alleles occur when a point mutation in the flanking region leads to a nonamplification of the microsatellite (Jarne & Lagoda 1996). Significant deviations from HWE for individuals of the three populations and globally for each locus were evaluated using an exact probability test in GenePop 4.0. Allele frequencies, observed and expected heterozygosities, as well as excess of heterozygotes (F_{IS}) were analysed using Genepop 4.0. Linkage disequilibrium in overall populations was estimated using haploid males and computed with Genepop 4.0.

COI amplification and analysis

At least one individual was chosen in each population and for each symbiont combination. *COI* sequences were obtained by PCR amplification with the primer set COI-F-C1 and COI-R-C1 (Table 1). The PCR was conducted in a final volume of 25 µl with 10X PCR Optibuffer (Eurogentec), 0.2 mM dNTPs (New England Biolabs), 1.5 mM MgCl₂, 400 nM of each primer, 1 unit of DAp GoldStar®, (Eurogentec) and 10 ng of insect DNA extract. The program used was a first step of denaturation at 94°C for 5 min followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, 57°C for 1 min, 72°C for 1 min, with a final elongation step for 7 min at 72°C. Each PCR product was sequenced (Macrogen Inc. sequencing service, Korea). Sequence identities were confirmed using NCBI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequences produced in this study were submitted to GenBank and referenced from HQ621746 to HQ621759. Ten other *Bemisia tabaci* *COI* sequences were obtained from public sequence databases using Tax browser (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html>). Multiple sequence alignments were constructed using the CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) based subalignment tool available in MEGA version 4 (Tamura *et al.* 2007) and by manual editing. The optimal model of sequence evolution defined by ModelTest (Posada 2006) was used for phylogenetic reconstruction (HKY85+G). The maximum likelihood (ML) tree was constructed with PHYML (Guindon *et al.* 2005). Nodes supported for the ML tree were estimated with 1000 bootstrap replicates.

Symbiont diversity

Secondary symbiont community detection

First, we checked the quality of the bacterial DNA extraction, using primers PortF/PortR for PCR detection of the primary symbiont *Portiera aleyrodidarum* (Table 1). PCR was conducted in a final volume of 25 µl with 10X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs (New England Biolabs), 2 mM MgCl₂, 400 nM of each primer, 0.75 unit of *Taq* polymerase (RegGoldstar, Eurogentec) and 10 ng of insect DNA extract. The PCR program used a first step of denaturation at 92°C for 2 min followed by 35 cycles at 92°C for 30 s, 52°C for 40 s, 72°C for 45 s and a final extension step at 72°C for 10 min. PCR products were visualized on 1% agarose gels.

A PCR multiplex was developed to detect the secondary symbiotic community of the field populations. The presence of five secondary symbionts was tested: *Cardinium*, *Hamiltonella*, *Rickettsia*, *Wolbachia* and *Arsenophonus*. We tested for *Fritschea* with a primer set described to amplify Chlamydiaceae (Everett *et al.* 1999) and successful for amplification of *Fritschea bemisiae* on *B. tabaci*, biotype A (Jatropha) (Thao *et al.* 2003). On 15 individuals (B, Ms and hybrids), no PCR signal was detected. In the absence of any positive control for *Fritschea*, we postponed its characterisation in our field populations. For multiplex analysis, 10 ng of the total insect DNA extract was used for amplification with the QIAGEN multiplex PCR Master Mix kit. For the five primer sets (Table 1), the mix after optimizations (conducted as for example in Clerget-Froidevaux *et al.* (2004)) was 800 nM for *Arsenophonus* and *Wolbachia* and 200 nM for *Cardinium*, *Rickettsia* and *Hamiltonella* in a final volume of 15 µl.

To ensure the specificity of the multiplex PCR, each amplification product was sub-cloned in pGEM-T (Promega) and sequenced (Macrogen Inc. sequencing service, Korea). Sequence identities were confirmed using NCBI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The PCR program used a first step of denaturation at 95°C for 15 min followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 58°C for 1 min 30 and 72°C for 1 min 15 and a final extension step at 72°C for 10 min. 2 µL of the 1/20th diluted PCR product were mixed with 10.7 µl of ultra-pure formamide and 0.3 µl of size marker (GeneScan 1200 Liz®, Foster City, CA, USA), and loaded onto an ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) automated sequencer. Detection of secondary symbionts was performed using Genemapper® v4.0.

Secondary symbiont community analysis

We have tested a null hypothesis of random hybridisation, *i.e.* that hybrids produced by a Ms female and a B male have prevalences of symbiont combinations similar to prevalences of their maternal ancestor, in the case of symbiont maternal transmission. The same analysis was considered for hybrids produced by a B female and a Ms male. Though, the distribution of symbiotic combinations within the hybrid population was analysed by comparing the expected infection frequencies in hybrids to the infection frequencies observed in the parental populations B and Ms. Departure from the expected infection frequencies in the hybrid population was computed with an exact binomial test using R. We did not consider non-infected individuals, as their maternal symbiotype may either be Ms or B.

Genetic structure versus symbiotic diversity

To assess whether symbiotic combinations, sites or host plant structured the nuclear genetic diversity of *B. tabaci* biotypes, a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) was performed using ARLEQUIN version 3.11 (Excoffier *et al.* 2005). We performed two analyses for each of the three populations Ms, B and Hy. First, genetic variation was partitioned into the three following levels: among symbiont combinations (F_{CT}), within symbiont combinations among sites (F_{SC}) and within sites (F_{ST}). Second, genetic variation was partitioned into three different levels: among symbiont combinations (F_{CT}), within symbiont combinations among host plants (F_{SC}) and within host plants (F_{ST}). All other combinations of clustering levels were analysed as well. Sites were grouped by geographic region: north, south, east, and west. Host plants were grouped as weeds for: annual poinsettia, lantana and garden spurge, and grouped as cultivated plants for: poinsettia, tomato, eggplant, sweet potato, zucchini and bean. Significance was tested by 10,000 permutations as described by Excoffier *et al.* (2005).

To assess for non-random hybridisation between Ms and B genetic groups, cytonuclear disequilibrium (CND) was tested and computed between symbiont and microsatellite markers using CNDm computer program (Basten & Asmussen 1997). We first tested each symbiont combination-locus association for significant overall departure from random association with a Monte Carlo approach used for small sample sizes (Basten & Asmussen 1997). Two populations were analysed : i) the parental Ms and B individuals, taken

Table 2. Allele frequency based correlation (F_{IS}) and heterozygosity (H) calculated with female individuals. Observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E) and the fixation indice F_{IS} of (Weir & Cockerham 1984) were given by the software GenePop 4.0. Null allele frequencies (r) were manually computed using haploid males. Na: allele numbers

Alleles	Na	H_O			H_E			F_{IS} (r)		
		B	Hy	Ms	B	Hy	Ms	B	Hy	Ms
<i>P62</i>	5	0.24	0.68	0.76	0.28	0.59	0.57	0.15	-0.14	-0.33
<i>P32</i>	7	0.65	0.31	0.28	0.59	0.68	0.60	-0.1	0.55	0.53
<i>P53</i>	11	0.65	0.38	0.29	0.72	0.86	0.79	0.1	0.56 (0.29)	0.63 (0.24)
<i>P59</i>	10	0.45	0.30	0.29	0.77	0.75	0.58	0.41	0.61	0.51
<i>P5</i>	7	0.13	0.23	0.48	0.15	0.53	0.64	0.13	0.57	0.25
<i>P7</i>	3	0.17	0.19	0.26	0.20	0.38	0.41	0.17 (0.29)	0.52 (0.4)	0.37 (0.26)
<i>P11</i>	7	0.16	0.06	0.09	0.61	0.29	0.24	0.74 (0.37)	0.8	0.63
<i>P41</i>	3	0.54	0.25	0.01	0.49	0.32	0.02	-0.1 (0.51)	0.21 (0.49)	0.72 (0.49)
<i>Bem25</i>	8	0.44	0.28	0.18	0.63	0.49	0.30	0.3	0.45 (0.6)	0.39 (0.56)
<i>Ms145</i>	5	0.25	0.24	0.24	0.60	0.64	0.50	0.58	0.62	0.53

F_{IS} in bold indicate loci with a significant deficiency of heterozygotes.
Only null allele frequencies, $r > 0.2$, are indicated between brackets.

together; ii) the hybrid individuals, with the exception of the F1 generation (to avoid data with lack of crossing overs between parental chromosomes). Second, for those loci that showed significant departures, we examined the association between symbiont combinations and nuclear alleles. We examined and tested the normalized disequilibrium D^* (D^* is the disequilibrium divided by its maximum possible values; (Asmussen & Basten 1996)) with an exact Fisher test. A significantly positive (or negative) value of D^* indicates a positive (or negative) association between a symbiotic combination and a nuclear allele, respectively.

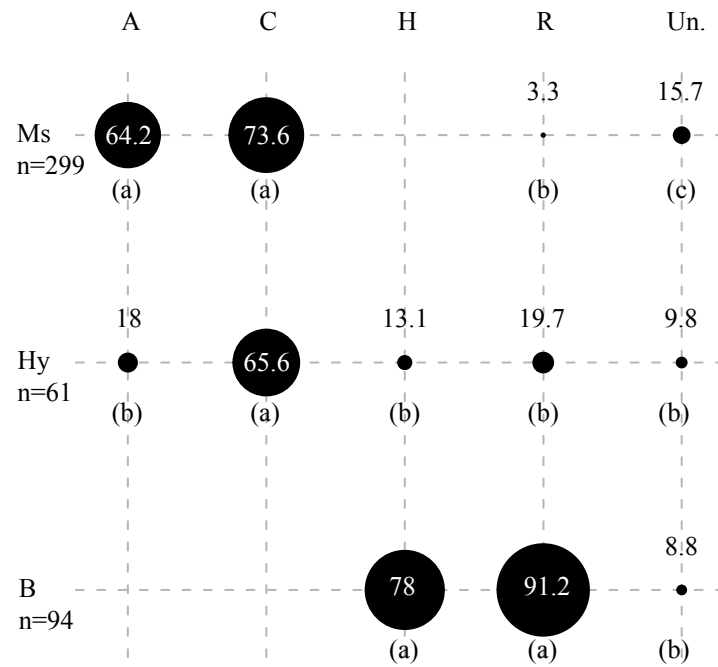
Results

Genetic structure of Bemisia tabaci populations in La Réunion

Population structure and diversity in Ms, B and hybrid populations, previously described from 2001-2002 samplings (Delatte *et al.* 2006), was investigated on 2006 samplings with the analysis of ten microsatellite markers. We analysed microsatellite data and assignation probabilities given by STRUCTURE, and considered that an individual assignation probability in the [0.10; 0.90] interval belonged to a hybrid genotype. From 1040 whiteflies collected in 30 sites on nine different host plants, we found according to STRUCTURE software, 731, 190 and 119 individuals assigned to Ms, B and Hy populations respectively (Fig. 1).

Due to their haploid status, males were not used in further genetic analyses. The dataset of the 787 remaining females was composed of 564 Ms, 149 B and 74 hybrid individuals. The ten loci counted three to eleven distinct alleles each, representing a total number of 66 alleles (Table 2). B and Ms biotypes counted 51 different alleles each and the hybrid population counted 58 different alleles. A highly significant deviation from HWE ($P < 0.001$) was observed among all loci, caused by a global deficiency in heterozygotes (fixation indice F_{IS}), as previously documented for eight of these loci (Delatte *et al.* 2006). Exceptions with non significant F_{IS} are P41 (B and Hy populations), P62 (Ms and Hy populations) and P32 (B population). As the presence of null alleles can cause an artificial deficit in heterozygotes, we calculated them manually, using haploid males (Table 2). Half of the loci have null allele frequencies < 0.2 , for each of the three populations. Even though, individual assignations such as those obtained with STRUCTURE are considered as reliable if locus numbers (in this study, ten loci) and levels of genetic differentiation are sufficiently

A.



B.

	A	C	C/A	H/R	R	R/C/A	Un.
Ms (n=299)	10.7 (a)	20.1 (b)	50.2 (c)	-	-	3.3 (d)	15.7 (a)
Hy (n=61)	8.2 (a)	55.7 (c)	6.6 (a)	13.1 (a)	3.3 (a)	3.3 (a)	9.8 (a)
B (n=94)	-	-	-	78 (b)	13.2 (c)	-	8.8 (a)

Figure 3. Secondary symbiont infection frequencies of field-collected individuals of Ms, hybrid (Hy) and B populations of *Bemisia tabaci* on La Réunion.

A) Infection frequencies for each endosymbiont tested, B) Infection frequencies of the different endosymbiont combinations observed.

Statistical analyses (Fisher test) within a same population between symbionts are indicated with letters. Frequencies with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

A: *Arsenophonus*, C: *Cardinium*, H: *Hamiltonella*, R: *Rickettsia*, Un.: Undetected

high, as is the case for this study (Carlsson 2008). Furthermore, we tested for linkage disequilibrium for each locus : among 45 possible linkages, only 5 were shown to be significant (estimation using haploid males). Taken together, our results indicate that we may consider the microsatellite analyses of our study as reliable.

The Principal Component Analysis (PCA) (Fig. 2) confirmed the Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE. Principal components 1 and 2 (PC1 and PC2) explained 24% of the total genetic variation, with 14.8% and 9.2% for the first and the second component respectively. The PCA clearly separated three groups of genotypes on the first axis (PC1). A first group with positive coordinates [0; 1] on PC1 was composed of Ms biotype individuals, a second group with negative coordinates [0; -1] on PC1 was composed of B biotype individuals and an intermediate group with a PC1 coordinate close to zero was composed of hybrid individuals. The second axis (PC2) discriminated slightly B population (positive coordinates) and hybrid population (negative coordinates).

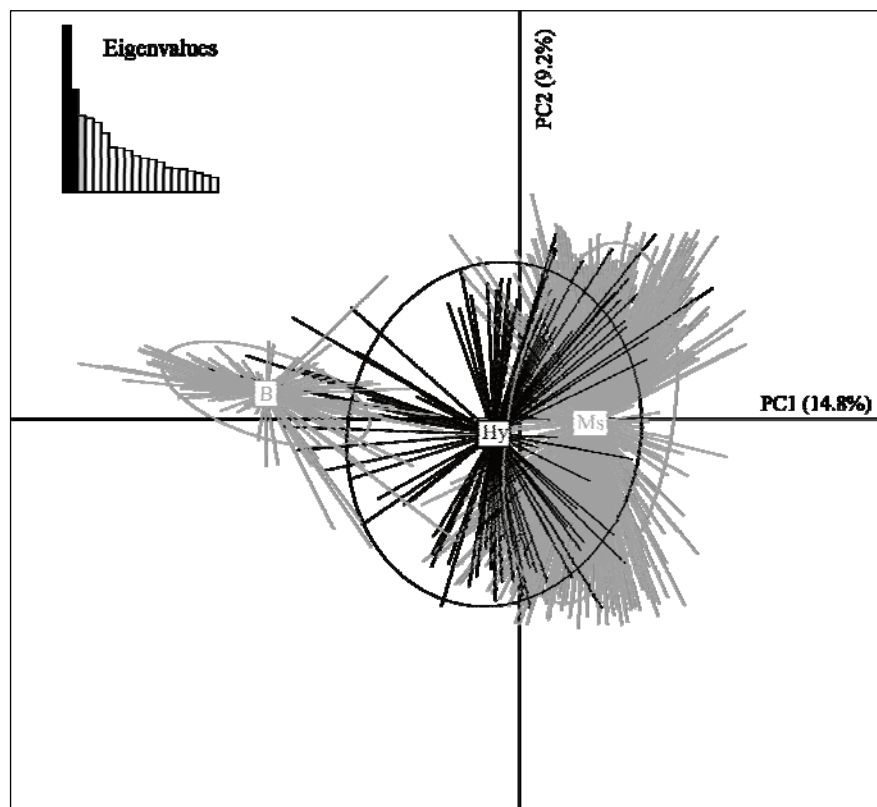


Figure 2. Multivariate analysis of *Bemisia tabaci* populations on La Réunion.

First and second components of a Principal Component Analysis of 10-loci microsatellites from *B. tabaci* females from the three populations B, Hy and Ms defined by STRUCTURE software. The relative contributions of the two first axes (PC1 and PC2) to the total genetic variation are 14.8% and 9.2% respectively. Eigenvalues corresponding to the represented components are filled in black. Populations are labelled inside their 95% inertia ellipses.

Secondary symbiotic community

The multiplex characterisation of five facultative symbionts was performed on a set of 454 individuals belonging to the three populations studied (299 Ms, 94 B and 61 hybrids). We found a significant differential pattern of distribution of the symbiotic community among Ms and B populations, with the hybrids encompassing both patterns (Fig.3A).

Cardinium and *Arsenophonus* were the predominant symbionts and were equally distributed within the Ms biotype population (73.6% and 64.2% respectively). A few individuals infected with *Rickettsia* were identified (3.3%). Finally, individuals without any of the 5 symbionts tested (15.7%) were found (Fig. 3A).

We also analysed the differences in symbiont combinations (Fig. 3B). In the Ms population, half of the individuals carried both *Cardinium* and *Arsenophonus* (50.2%). A significantly smaller combination included *Rickettsia*, *Cardinium* and *Arsenophonus* (3.3%). The remaining Ms individuals were either infected by *Arsenophonus* or *Cardinium* alone (10.7% and 20.1% respectively). *Rickettsia* and *Hamiltonella* were the two symbionts found in the B biotype population at similar prevalence (91.2% and 78% respectively). A few individuals without any of the five symbionts tested were also found (8.8%). The majority of B individuals were infected with both *Hamiltonella* and *Rickettsia* (78%). A minority carried *Rickettsia* alone (13.2%). No B biotype individuals carrying *Hamiltonella* only was detected in our sample. None of the B and Ms individual tested carried *Wolbachia*.

As for the hybrids, no new combinations of symbionts were observed. The respective proportions of each symbiont taken individually (Fig. 3A), or of each symbiotype (Fig. 3B), was found to be significantly different from the ones in the parental Ms or B biotypes (see legend in Fig. 3). One explanation could be that the hybrids harbour, either the maternal symbiotype of B, or the maternal symbiotype of Ms, with different proportions according to the matings which were successful, and/or to the fittest hybrids. This observation relies on the fact that the hybrid symbiotypes are believed to be maternally transmitted. We thus examined if the symbiotypes of the hybrids corresponded to their maternal, *i.e.* mitochondrial origin.

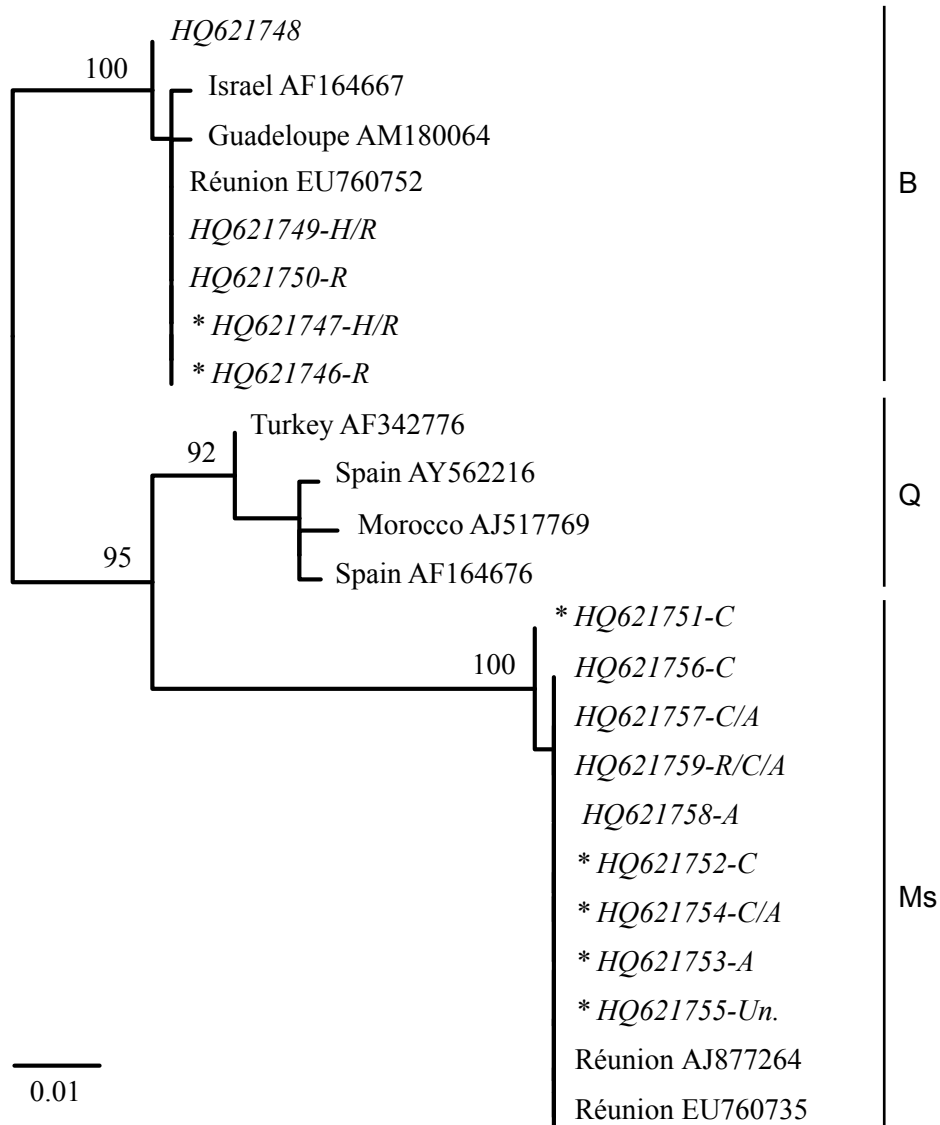


Figure 4. Phylogeny of *Bemisia tabaci* based on 450 bp of *COI* gene. A phylogenetic tree was constructed with by maximum-likelihood analysis under a HKY85 substitution model using PhyML program. Bootstrap values were computed with 1000 replicates and only bootstraps above 60 are indicated. Sequences in italics were produced in this study, submitted to GenBank and referenced from *HQ621746* to *HQ621759*. *: hybrid sequences. Eleven other *B.tabaci* *COI* sequences were used in the analysis, including biotype B from Israel, Guadeloupe and La Réunion (AF164667, AM180064 and EU760752 respectively) ; biotype Q (outgroup) from Turkey (AF342776), Morocco (AJ517769) and Spain (AY562216 and AF164676) ; biotype Ms from La Réunion (AJ877264, AJ877264, EU760735 and EU760759 respectively).

Genetic structure versus symbiont diversity

Mitochondrial versus microsatellite identity and symbiotic diversity

Insect symbionts are considered to be mainly transmitted maternally. Because symbionts can potentially be transmitted horizontally (Sandstrom *et al.* 2001; Moran & Dunbar 2006; Chiel *et al.* 2009b), we checked the congruence between *COI* mitochondrial gene identity (maternal transmission) and the symbiont combinations of hybrid individuals. All the hybrids with available insect DNA were analysed (60% and 65% of the hybrid individuals harbouring a Ms or a B symbiotype, respectively) for *COI* identification. All *COI* sequences matched perfectly with the biotype harbouring the same symbiont combination (data not shown). For each symbiotype and Ms, B or hybrid representative, one *COI* sequence was used for the construction of a maximum likelihood phylogenetic tree, together with known sequences of B, Ms and Q biotypes (Fig. 4). The tree was rooted with Q biotype sequences. Hybrids assigned to the B or to the Ms biotype, using nuclear microsatellite data, clustered with sequences of the B biotype and Ms biotype respectively (100% bootstrap support for both clades). Moreover, hybrids assigned to a B or Ms maternal origin according to their symbiotype, also clustered with sequences of the B biotype and Ms biotype respectively (100% bootstrap support for both clades). For example, hybrid individuals harbouring *Hamiltonella* and *Rickettsia* in co-infection or *Rickettsia* alone clustered (100% bootstrap support) with sequences of the B biotype individuals of La Réunion, Israel and Guadeloupe. Hybrid individuals harbouring *Cardinium*, *Arsenophonus* and *Rickettsia* alone or in co-infection clustered (100% bootstrap support) with sequences of the Ms biotype of La Réunion. According to our results, we considered the majority of hybrid individuals with a given symbiotype, as from a corresponding maternal Ms or B origin.

Hybrids genetic composition versus symbiotype

We looked at the probabilities of assignment obtained with STRUCTURE and microsatellite data of the female hybrids, as to analyse their relationships with their maternal symbiotype (Fig. 5). Among the hybrids, the first generation F1 is expected to have a probability of assignment to B or Ms biotypes between 0.5 and 0.6 (toward B or Ms); 14% of the hybrids have such a probability. The remaining 86% are possibly issued from inter-hybrid

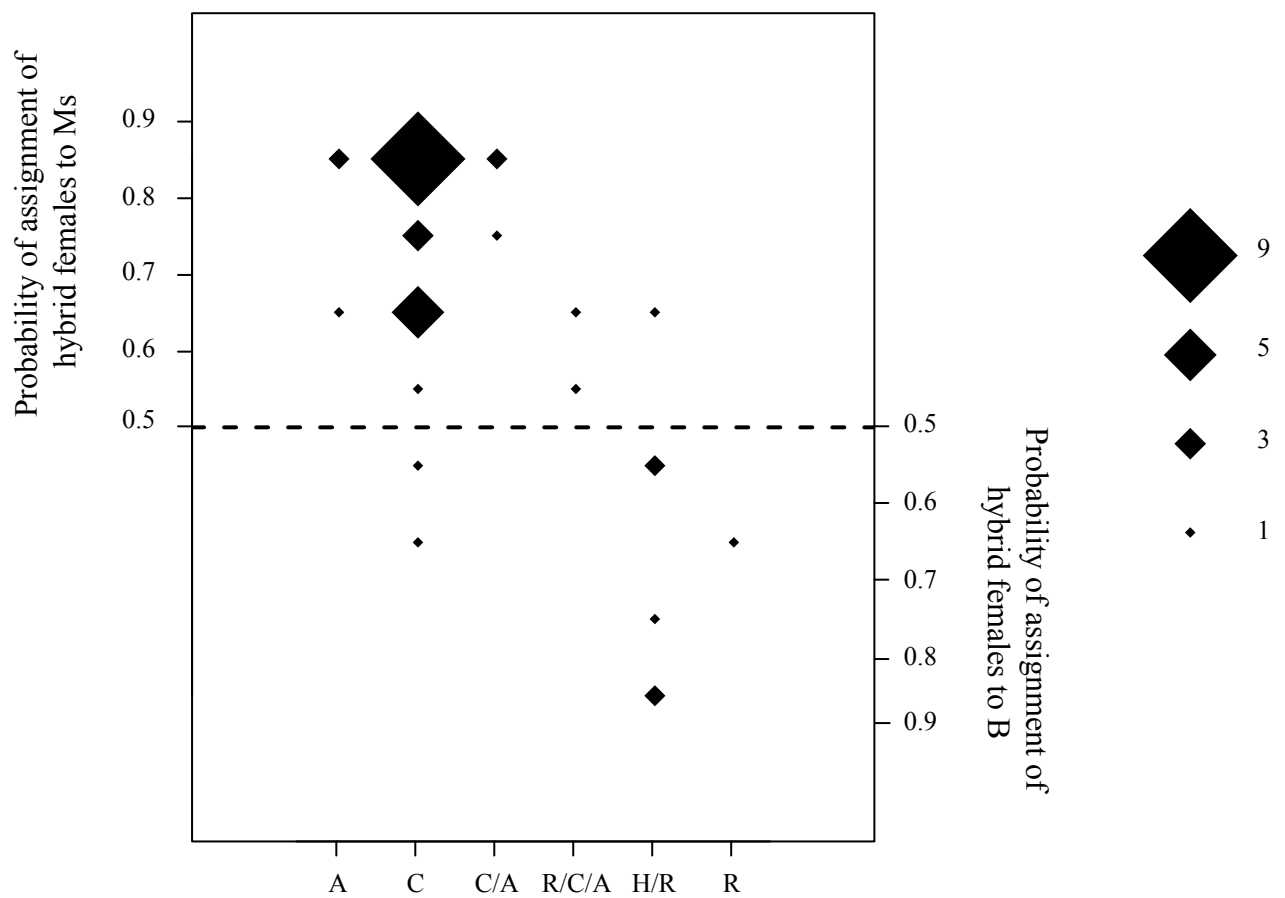


Figure 5. Genotypic composition of *Bemisia tabaci* female hybrids defined by STRUCTURE according to the endosymbiont assemblages detected (A: *Arsenophonus*, C: *Cardinium*, R: *Rickettsia*, H: *Hamiltonella*). Above the 50% threshold (dashed line) hybrids are assigned to Ms cluster and below, hybrids are assigned to B cluster. Symbols are proportional in size to the number of individuals. Fisher tests between the two clusters were significant ($P < 0.001$). Within each symbiont combination, significant differences were found between the two clusters ($P < 0.001$ for C and H/R). None of the A-harboring individuals are assigned to B cluster (nearly significant, due to scarce individuals). Assignment probabilities values were classified as follows : between 0.5-0.6, 0.6-0.7, 0.7-0.8, 0.8-0.9.

matings, or backcrosses. The major contributor of the hybrid genotype appears to be the Ms biotype (71% of the hybrids have a probability of assignment toward Ms genotype, *i.e.* issued from backcrosses or hybrid x Ms matings). On the contrary, only 14% of hybrids have probabilities of assignment toward B genotype, *i.e.* issued from backcrosses or hybrid x B matings. These data are in agreement with the high proportion (79%) of the Ms individuals collected, *versus* the low proportion of B individuals (19%) (see Fig. 1). Taken together, our results indicate that hybrid individuals originated from different matings between B, Ms and hybrids.

We tested the distribution of each individual infection status according to the probability of assignment with a binomial test (R software) (Fig. 5). The majority of the hybrid females genetically close to the Ms population were infected by *Cardinium* (56%, $P < 0.001$), a specific Ms symbiotype. The remaining hybrid females harboured a Ms symbiotype as well. Hybrids harbouring *Arsenophonus* remained exclusively assigned to a probability of assignment to Ms, above 0.5. The majority of hybrid females genetically close to the B population harboured a B symbiotype, *i.e.* *Hamiltonella/Rickettsia* ($P < 0.001$) or *Rickettsia* alone. In conclusion, the different symbiotypes observed are closely linked to the nuclear genotype of the hybrids. Interestingly, some *bias* in the repartition of the different symbiotypes are highlighted on Fig. 5; for example, *Arsenophonus* seems to be under-represented in the hybrids, as compared to its initial prevalence in the maternal Ms population. The different proportions of the symbiotypes observed in the hybrids were subsequently tested.

Non-random hybridisation between Ms and B biotypes

In the case of random hybridisation between these Ms and B biotypes (whatever the initial proportion of B and Ms), half of the assumed F1 hybrids should be of Ms symbiotype, and half should be of B symbiotype. We found a significant departure ($P < 0.001$) from the expected distribution: a majority (75%) of the assumed F1 hybrids (assignment probabilities between 0.4 and 0.6) harbour a Ms symbiotype. This result indicates the existence of non-random hybridisation between B and Ms biotypes.

We further analysed each symbiotic combination found in the hybrids, either of Ms maternal origin, or of B maternal origin. For each maternal origin, we calculated the expected symbiotic frequencies under the null hypothesis of random hybridisation, based on the

frequencies observed in the parental populations. We then compared them to the observed frequencies (Fig. 6).

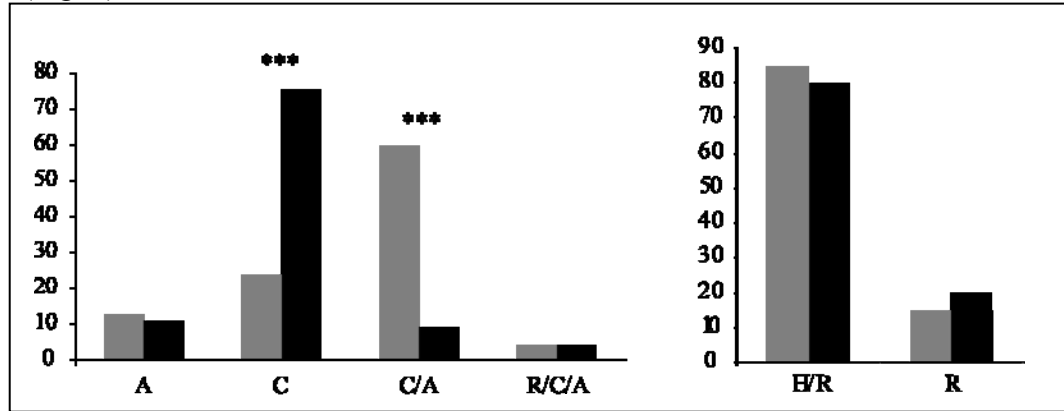


Figure 6. Expected (grey bars) and observed (black bars) symbiont combination frequencies in the hybrid population. Left: hybrids harbouring Ms symbiotypes. Right: hybrids harbouring B symbiotypes. A: *Arsenophonus*; C: *Cardinium*; H: *Hamiltonella*; R: *Rickettsia*. *** ($P < 0.001$): highly significant departure from the expected frequencies computed using a binomial test.

First, for the Ms symbiotypes, *Cardinium/Arsenophonus* bi-infections are far less frequent than expected (9% instead of 60%, $p < 0.001$). The opposite observation stands for mono-infected *Cardinium* (76% versus 24% expected, $P < 0.001$). We did not find significant departures for other Ms symbiotypes. When analysing the symbionts individually, only *Arsenophonus* is significantly lower (20% observed) as expected (73%, $P < 0.001$) in hybrids of Ms maternal origin. According to the observed frequencies in hybrids, and their respective confidence intervals provided by binomial tests, different *scenarii* can be proposed: *i*) a low *Arsenophonus* vertical transmission efficiency in hybrids, either in all symbiotypes including *Arsenophonus* (from 28% to 31% transmission efficiency) or if coinfecting with *Cardinium* (20-50% transmission efficiency); *ii*) a low frequency of viable hybrids harbouring *Arsenophonus*, either in all symbiotypes including *Arsenophonus* (25-32% viability) or if coinfecting with *Cardinium* (13-36% viability). In hybrids of B maternal origin, we did not find any significant differences between expected and observed frequencies.

Genetic variation according to sampling site, host plant and symbiotype

The genetic variation, according to sampling site (north, east, south, west, see Fig. 1), symbiotype and host plants (cultivated or weed, see Materials and Methods) was studied with an AMOVA (Table 3A and B, and data not shown). Table 3 shows the first level of clustering

Table 3. AMOVA (Analysis of molecular variance) : Significant genetical variation of hybrids females individuals, according to symbiont combinations.

Analysis of molecular variance (V), percentage of variation (%) and F-statistics (F) of genetic computed by the method implemented in Arlequin 3.1 of Excoffier et al. (2005) for B, Hy and Ms populations. A: genetic variation is partitioned into three levels: among symbiont combinations (F_{CT}), within symbiont combinations among sites (F_{SC}) and within sites (F_{ST}). B: genetic variation is partitioned into three levels: among symbiont combinations (F_{CT}), within symbiont combinations among host plants (F_{SC}) and within host plants (F_{ST}). Groups comprising less than 3 individuals were discarded from the analysis.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

A. Source of variation according to sampling site differentiation									
	V	B %	F	V	Hy %	F	V	Ms %	F
Among symbiont combinations (F_{CT})	0.036	1.406	0.014	0.547	17.85	0.178***	0.014	0.627	0.006*
Among sites within symbiont combinations (F_{SC})	-0.044	-1.680	-0.014	0.238	7.788	0.094	0.032	1.447	0.014
Within sites (F_{ST})	2.632	100	-0.002	2.278	74.352	0.256***	2.209	97.92	0.020
B. Source of variation according to host plant differentiation									
	V	B %	F	V	Hy %	F	V	Ms %	F
Among symbiont combinations (F_{CT})	-0.014	-0.564	-0.00565	0.437	16.797	0.167***	-0.070	-2.947	-0.029
Among host plants within symbiont combinations (F_{SC})	0.028	1.136	0.0113	-0.020	-0.788	-0.009	0.115	4.789	0.046*
Within host plants (F_{ST})	2.465	99.428	0.0057	2.189	83.99	0.160***	2.360	98.157	0.018**

according to symbiotype, and the second level according to sampling site (Table 3A) or host plant (Table 3B). The other combinations of first and second clustering levels were analysed in parallel (data not shown). In each of the B and Ms populations studied, the major source of variation (98-100%) was observed between individuals of a same sub-group, whatever the first and second levels of clustering (Table 3, and data not shown). In the Ms population, significant F-statistics were found among symbiotypes whether clustered or not by host plant or site (F-statistics ranging from 0.002 to 0.046, $p < 0.05$), albeit accounting for only 0.6-4.8% of the variation observed (Table 3, and data not shown). No significant F-statistics were found for the B biotype. As for the hybrids, the level of genetic differentiation among symbiotype groups was quite strong and significant (F-statistics ranging from 0.157 to 0.178, $p < 0.001$), accounting for 17 to 18% of genetic variation; the latter results are similar, whether globally or after a second level of clustering according to sampling site or host plant (Table 3A and B., and data not shown). However, within a given symbiotic combination, no significant F-statistics were observed in the hybrids, according to site or host plant. In other words, unlike B and Ms biotypes, the hybrids are genetically differentiated according to symbiotypes, that is according to their maternal origin, whether clustered or not into sub-groups.

As we found a significant differentiation between hybrids harbouring different symbiotic combinations (Fig. 5 and Table 3), we further analysed if different alleles could be linked to different combinations of symbionts.

Cytonuclear disequilibrium

Non-random hybridisation or fitness differences among reciprocal hybrids are expected to produce cytonuclear disequilibria in the hybrid individuals studied. First, we estimated the linkage disequilibrium between nuclear (microsatellite) markers and the parental population, *i.e.* B and Ms individuals. For each association, we assessed for the normalized disequilibrium D^* and computed an exact test. Among the ten loci studied, a majority of alleles (41) are significantly associated to either biotype, B or Ms (data not shown). We then analysed cytonuclear disequilibria, between symbiotypes and allelic nuclear data, in the parental populations (B and Ms individuals analysed together). Among the symbiotypes specific to a B maternal origin, only the *Hamiltonella/Rickettsia* symbiotype has been analysed, due to scarce data for the *Rickettsia* (R) symbiotype (one hybrid only). The alleles significantly linked to any symbiotype are highlighted (Table 4, left series of columns). A similar analysis of the cytonuclear disequilibria was performed in the hybrids. If random

and equally successful hybridisation occurred, we would expect a loss of parental cytonuclear associations. For 36 of the 41 parental linked alleles, this is indeed the case. On the contrary, for the *Hamiltonella/Rickettsia* symbiotype, seven parental cytonuclear associations are maintained in the hybrids. For the *Cardinium* symbiotype as well, 5 cytonuclear associations remain similar to those observed in the Ms ancestors. For symbiotypes including *Arsenophonus*, three positive associations with Ms-specific alleles and described for the parental Ms are maintained. Interestingly, new cytonuclear associations are observed in hybrids harbouring *Arsenophonus*: positive links with 5 Ms-specific alleles and 3 B-specific alleles, as well as negative links with 3 B-specific alleles. Taken together, our results show strong cytonuclear disequilibrium in the hybrids, with 14 maintained parental associations, as well as 10 associations observed *de novo*.

Discussion

In this study, evidence from genetic and endosymbiotic data drawn from two hybridising cryptic species of *Bemisia tabaci* provide important insights for the understanding of processes that maintain these population in sympatry. For the first time, symbiont diversity, linked to mitochondrial, nuclear and ecological data, are described on two field populations of *B. tabaci* and their hybrids.

The genetic structure analysis (STRUCTURE and PCA) of 2006 field populations of *B. tabaci* of La Réunion confirmed the study of Delatte *et al.* (2006) for the presence of admixed individuals of the invasive B and the indigenous Ms populations. With respect to assignment analyses, we found that the hybrid population is composed of both F1 and backcross individuals toward Ms biotype.

We found a high diversity of secondary symbionts among *B. tabaci* populations of La Réunion. In addition to the primary symbiont *Portiera aleyrodidarum*, we detected four different secondary symbionts: *Hamiltonella*, *Rickettsia*, *Cardinium* and *Arsenophonus*. *Fritschea* and *Wolbachia* were not detected in our populations. We also highlighted the difference of symbiont community between the two sympatric B and Ms biotypes.

The symbiont community of the indigenous Ms biotype was exhaustively detailed, from nearly 300 field individuals. In addition to *Rickettsia* and *Cardinium* found in a Ms laboratory population (Gueguen *et al.* 2010), *Arsenophonus* is detected. *Cardinium* and *Arsenophonus* are observed at a high prevalence. Our study includes two new symbiont

assemblages in *B. tabaci* populations: co-infection of *Cardinium* and *Arsenophonus*, and rare multiple infection with *Rickettsia*, *Cardinium* and *Arsenophonus*.

Hamiltonella and *Rickettsia* are found in the B population of La Réunion at high prevalence. The majority of the B individuals are co-infected by both symbionts. Consistently, the B biotypes studied from elsewhere (Israel, Tunisia and Antilles Islands) are mostly co-infected by the same symbionts (Chiel *et al.* 2007; Gueguen *et al.* 2010).

Rickettsia is the only bacteria found in the two populations, in triple infection with *Cardinium* and *Arsenophonus* for Ms, and alone or in bi-infection with *Hamiltonella* for B. The detection of *Rickettsia* in both biotypes may be explained by horizontal transfer events, as suggested in *B. tabaci* (Chiel *et al.* 2009b; Gueguen *et al.* 2010).

The role of symbionts remains largely unknown in *B. tabaci*, except the description of a possible cost of *Rickettsia* in presence of insecticides (Kontsedalov *et al.* 2008; Ghanim & Kontsedalov 2009). We found no evidence of any variation in *Rickettsia* prevalence between cultivated plants (insecticide-treated) or weeds (untreated) (data not shown). Also, *Hamiltonella* has recently been associated to an efficient transmission of the TYLCV by *B. tabaci*, albeit *in vitro* (Gottlieb *et al.* 2010). As *B. tabaci* Ms and B biotypes are known to transfer the TYLCV virus to cultivated plants in La Réunion (Delatte *et al.* 2005), the role of *Hamiltonella* in this context remains to be further investigated.

We found that genetic differentiation within the hybrid population is linked to their symbiotype. The different hybrid symbiotypes are either similar to Ms or B symbiotypes. The observed correlation between the hybrid mitochondrial *COI* sequences and their respective symbiotypes suggest a preponderant maternal transmission of the secondary symbionts. Thus, we assumed that hybrids symbiotypes represent their maternal ancestry (B or Ms).

First of all, a significant majority of the F1 hybrids harbours a Ms symbiotype instead of the expected 50% whatever the initial proportion of Ms and B biotypes. This result indicates the existence of non-random hybridisation between Ms and B populations: the F1 hybrids observed are mainly issued from matings of Ms females with B males. Second, the symbiotypes (Ms or B) of subsequent hybrid generations are mainly correlated to the probability of assignment of Ms or B respectively, suggesting again non-random hybridisation. Third, when comparing the expected *versus* observed symbiotype frequencies in hybrids, we found significant departure for hybrids of Ms maternal origin. A major difference was observed for the *Cardinium*/*Arsenophonus* co-infection (strikingly less than expected), as well as for the *Cardinium* mono-infection (far more than expected). Analysed

individually, only *Arsenophonus* prevalence, but not *Cardinium* prevalence, was less than expected. We could hypothetise, either a loss of *Arsenophonus* in viable hybrids, or a low fitness of hybrids carrying *Arsenophonus*. These hypotheses could be considered, either for *Arsenophonus* in general, or for *Arsenophonus* if in co-infection with *Cardinium*.

Non-random hybridisation can be due to prezygotic barriers as assortative matings (Arnold 1993), which have been documented between different biotypes of *B. tabaci* that meet each other in a secondary contact (reviewed in De Barro *et al.* (2010)). Differential life-history traits and mating behaviours between B and Ms biotypes have been described in La Réunion ((Delatte *et al.* 2009a), and our unpublished results), and may be involved in such prezygotic barriers. As well involved in non-random hybridisation are postzygotic barriers, occurring after a fertilization event between close populations. Postzygotic barriers may induce a fitness reduction, or even the inviability of hybrids (Dobzhansky 1970; Barton & Hewitt 1989). Genetic incompatibility is one of the mechanisms attributed to postzygotic isolation (Cruzan & Arnold 1999). Study and measures of associations between cytoplasmic and nuclear genes within a hybrid population can provide insights of such reproductive barriers between hybridizing taxa (Arnold 1993).

Our study provides evidence of a link between symbiont combinations and nuclear host alleles in an insect hybrid population. Indeed, a subset of the significant nucleo-symbiotic associations, present in B and Ms parents, are maintained in hybrids for all symbiont combinations considered. Interestingly, new allele-symbiont links (with negative associations for B-specific alleles, and positive associations for B and Ms-specific alleles) are found for all combinations including *Arsenophonus*. These results indicate that some nuclear elements, linked to the studied alleles, may be necessary (or deleterious) for *Arsenophonus* maintenance in a hybrid background.

Symbionts have been shown, in other arthropod groups, to influence the adaptation of the insect to its environment (Oliver *et al.* 2010), and/or to manipulate the reproduction of their hosts in ways that enhance their own transmission (Engelstadter & Hurst 2009). In other insect species, strains of *Arsenophonus* and *Cardinium* have been reported to manipulate reproduction (by parthenogenesis, male-killing or cytoplasmic incompatibility). Such manipulations rely on an impairment of proper meiosis or mitosis, *i.e.* on symbiont interactions with the hosts' nuclear genome before embryogenesis (Ferree *et al.* 2008; Perlman *et al.* 2008). Our observations, from field hybrids generated from closely related

species, raise the possibility of interactions between *Arsenophonus* and some particular nuclear alleles of *Bemisia tabaci*.

Acknowledgments

The authors thank M. Grondin for his excellent technical assistance, two anonymous referees who commented a previous version of the manuscript, S. Charlat, M. Noirot and especially F. Vavre for very helpful comments and discussions. The authors also address thanks for significant assistance in statistics to Frederic Chiroleu. This study was funded by the CIRAD and the “Conseil Régional de La Réunion”. M. Thierry is a recipient of a PhD fellowship from the Conseil Régional de La Réunion and the EU (European Social Fund).

***Chapitre III. Diversité génétique des
symbiotes secondaires de Bemisia tabaci***

Introduction

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale de ce manuscrit, la présence des bactéries symbiotiques est très répandue chez les arthropodes. De nombreux groupes d'insectes phytophages hébergent un symbiote primaire qui fournit les nutriments essentiels à la survie de l'hôte par l'absence de ces derniers dans leur alimentation (Moran & Baumann 2000). Ces associations proviennent d'une ancienne infection et d'une longue coévolution entre ces deux partenaires (Thao & Baumann 2004). La transmission des symbiotes primaires est uniquement maternelle illustrée par des phylogénies parfaitement congruentes entre l'hôte et la bactérie (Baumann 2005). Ces insectes hébergent également des symbiotes secondaires facultatifs, transmis maternellement. Leur distribution est très variable parmi les membres d'une même espèce ou entre des groupes d'insectes différents. La phylogénie de ces symbiotes secondaires est donc souvent très différente de celle de leur hôte et suggère de multiples événements de transfert horizontaux, d'acquisition et de pertes de ces bactéries au cours de l'évolution (Thao *et al.* 2000). Ces phénomènes seraient donc à l'origine de l'établissement de nouvelles symbioses (Moran *et al.* 2008).

L'aleurode *Bemisia tabaci* héberge une grande diversité de ces symbiotes, dont le symbiote primaire et obligatoire *Portiera aleyrodidarum* (Thao & Baumann 2004). En plus de ce symbiote obligatoire, *B. tabaci* héberge six symbiotes secondaires: *Cardinium*, *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Wolbachia*, *Rickettsia* et *Fritschea* (Zchori-Fein & Brown 2002; Everett *et al.* 2005). Des études précédentes montrent qu'il existe une forte corrélation entre les différents biotypes de *B. tabaci* et la communauté symbiotique (Chiel *et al.* 2007; Gueguen *et al.* 2010; Thierry *et al.* *In Press*). En plus de cette distribution non aléatoire, l'incroyable diversité de bactéries et les variations de fréquences d'infection entre les biotypes et au sein d'un même biotype montrent que les voies de transmission de ces bactéries et leurs rôles dans la biologie de l'insecte sont complexes. Les interactions avec leur hôte ont été décrites chez de nombreux groupes d'insectes allant du mutualisme au parasitisme de la reproduction (voir Introduction générale). Le rôle de ces bactéries dans la biologie de *B. tabaci* est encore largement inconnu.

Plusieurs biotypes sont présents à La Réunion et hébergent des communautés symbiotiques différentes (voir Chapitres I et II). Le biotype Q nouvellement introduit héberge *Rickettsia*, *Wolbachia* et *Arsenophonus* (groupe Q2) ainsi qu'*Hamiltonella* et *Cardinium* (groupe Q1). Le

biotype invasif B héberge *Hamiltonella* et *Rickettsia*. Enfin le biotype indigène Ms héberge *Cardinium*, *Arsenophonus* et *Rickettsia*. La présence d'une population hybride entre les biotypes B et Ms nous a permis de mettre en évidence des déséquilibres cyto-nucléaires chez ces hybrides, possiblement dus à des interactions négatives entre *Arsenophonus* chez le biotype Ms et certains allèles du biotype B (voir Chapitre II). Ces mêmes bactéries symbiotiques sont connues chez d'autres groupes d'arthropodes pour être mutualistes (*Hamiltonella* (Oliver *et al.* 2005), *Arsenophonus*, (Hansen *et al.* 2007)) ou manipulatrices de la reproduction (*Rickettsia*, *Wolbachia*, *Arsenophonus* et *Cardinium* revue dans (Duron *et al.* 2008a)) et participeraient à l'évolution de la structuration des populations d'hôte (Bordenstein 2003)

La contribution de certaines de ces bactéries dans l'évolution des populations de *B. tabaci* à La Réunion n'est donc probablement pas négligeable.

Une étude sur la communauté endosymbiotique chez *B. tabaci* a été réalisée sur des populations de terrain pour les biotypes B, Q (groupes Q1, Q2, et Q3), ASL (pour « *African Silverleafing* »), un biotype non identifiés en COI (« Thaï ») et sur une population de laboratoire pour le biotype Ms (Gueguen *et al.* 2010). Cette étude révèle d'une part, une grande diversité de souches bactériennes et la présence de co-infections de bactéries différentes au sein d'un même individu. Quatre souches différentes d'*Arsenophonus* ont été décrites chez les biotypes Q (groupes Q2 et Q3), ASL et « Thaï ». Deux souches de *Cardinium* ont été mises en évidence chez les biotypes Q (groupe Q1) et Ms. Enfin une seule souche de *Rickettsia*, *Wolbachia* et *Hamiltonella* a été trouvée dans l'ensemble des biotypes testés.

Vu la diversité des symbiotes secondaires dans les populations de La Réunion et les interactions de ces mêmes bactéries avec leur hôte chez d'autres groupes d'arthropodes, il semble important de pouvoir déterminer s'il existe plusieurs souches d'une même bactérie dans nos populations et leurs relations phylogénétiques avec les biotypes présents à La Réunion et dans le monde.

Cette étude porte donc sur l'étude phylogénétique des différentes bactéries hébergées par les populations de *B. tabaci* de La Réunion et discute des hypothèses des possibles voies de transmission horizontale.

Tableau 1. Informations sur les échantillons de *Bemisia tabaci* utilisés pour les phylogénies des différents symbiotes détectés dans les populations de La Réunion.

Symbiote	Gène	Références échantillon	Date prélèvement	Plante hôte	Biotype ou population	Statut d'infection
<i>Cardinium</i>	<i>16S</i>	sg24	2006	adventice	Ms	<i>Cardinium</i>
		gb81	2006	adventice	Ms	<i>Cardinium</i> / <i>Arsenophonus</i>
		rs45	2006	adventice	Hy	<i>Cardinium</i>
		rs47	2006	adventice	Hy	<i>Cardinium</i> / <i>Arsenophonus</i>
		sp91	2010	adventice	Q1	<i>Cardinium</i>
		sp15	2010	adventice	Q1	<i>Hamiltonella</i> / <i>Cardinium</i>
<i>Arsenophonus</i>	<i>fbaA</i>	sp29	2010	cultivée	Ms	<i>Arsenophonus</i>
		sj49	2010	cultivée	Ms	<i>Arsenophonus</i>
		pi21	2010	cultivée	Ms	<i>Arsenophonus</i>
		sa45	2010	cultivée	Ms	<i>Rickettsia</i> / <i>Cardinium</i> / <i>Arsenophonus</i>
		sj66	2010	adventice	Ms	<i>Rickettsia</i> / <i>Cardinium</i> / <i>Arsenophonus</i>
		sa16	2010	adventice	Ms	<i>Rickettsia</i> / <i>Cardinium</i> / <i>Arsenophonus</i>
		pi1	2010	cultivée	Ms	<i>Cardinium</i> / <i>Arsenophonus</i>
		sr43	2010	adventice	Ms	<i>Cardinium</i> / <i>Arsenophonus</i>
		sp32	2010	adventice	Ms	<i>Cardinium</i> / <i>Arsenophonus</i>
		sg11	2010	adventice	Hy	<i>Cardinium</i> / <i>Arsenophonus</i>
		sg94	2010	adventice	Hy	<i>Arsenophonus</i>
		sa39	2010	adventice	Hy	<i>Cardinium</i> / <i>Arsenophonus</i>
		sa53	2010	cultivée	Hy	<i>Arsenophonus</i>
		sp29	2010	cultivée	Q2	<i>Rickettsia</i> / <i>Wolbachia</i> / <i>Arsenophonus</i>
		sp8	2010	cultivée	Q2	<i>Rickettsia</i> / <i>Wolbachia</i> / <i>Arsenophonus</i>
<i>Rickettsia</i>	<i>16S</i>	pe36	2006	cultivée	B	<i>Hamiltonella</i> / <i>Rickettsia</i>
		sl22	2006	cultivée	B	<i>Rickettsia</i>
		cc53	2006	adventice	Ms	<i>Rickettsia</i> / <i>Cardinium</i> / <i>Arsenophonus</i>
<i>Wolbachia</i>	<i>wsp</i>	sp66	2010	cultivée	Q1	<i>Rickettsia</i> / <i>Wolbachia</i>
		sp1	2010	cultivée	Q1	<i>Rickettsia</i> / <i>Wolbachia</i>
<i>Hamiltonella</i>	<i>16S</i>	pe36	2006	cultivée	B	<i>Hamiltonella</i> / <i>Rickettsia</i>
		bm27	2006	cultivée	B	<i>Hamiltonella</i> / <i>Rickettsia</i>
		sp13	2010	cultivée	Q1	<i>Hamiltonella</i> / <i>Cardinium</i>

Matériel et méthode

Échantillonnage

Les adultes de *B. tabaci* utilisés pour l'étude phylogénétique des endosymbiotes proviennent d'individus de terrain, collectés en 2006 et en 2010 sur l'île de La Réunion. Le biotype des adultes a été identifié dans des études précédentes (voir Chapitres I et II) grâce à l'analyse de dix marqueurs microsatellites. L'identification du statut d'infection de ces individus a également été déterminé précédemment grâce à la mise au point d'une PCR multiplexe (voir Chapitres I et II) ciblant les endosymbiotes secondaires de *B. tabaci* : *Cardinium*, *Arsenophonus*, *Rickettsia*, *Hamiltonella* et *Wolbachia*. Lorsque c'était possible, au moins un adulte par statut d'infection différent et par biotype a été choisi pour cette étude de phylogénie (Tableau 1).

Amplification et séquençage

Le gène *16S* a été amplifié pour l'étude de *Cardinium*, *Rickettsia* et *Hamiltonella* et le gène *wsp* pour *Wolbachia*. Au regard de la diversité des souches détectées pour *Arsenophonus* chez *B. tabaci* à partir du gène du *23S* (Gueguen *et al.* 2010), nous avons choisi d'utiliser le gène de ménage *fbaA*, présent en une seule copie dans le génome d'*Arsenophonus* (Duron *et al.* 2008a), contrairement au gène du *23S* présentant plusieurs copies (Darby *et al.* 2010). Les amorces utilisées pour les amplifications sont décrites dans le tableau 2.

Chaque réaction de PCR a été réalisée dans un volume final de 25 µl contenant 10X de tampon de PCR (Eurogentec), 0.2 mM de dNTPs (New England Biolabs), 1.5 mM de MgCl₂, 400 nM de chacune des amorces forward et reverse, une unité de polymérase haute fidélité DAp GoldStar® (Eurogentec) et l'équivalent de 10 ng d'extrait d'ADN d'insecte. Deux programmes différents ont été utilisés pour l'amplification. Le premier, utilisé pour *Cardinium*, *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Hamiltonella* et l'amplification du gène *23S* d'*Arsenophonus* comprend une première étape de dénaturation à 92°C pendant 5 min, suivie par 35 cycles à 92° pendant 30 sec, 56°C pendant 40 sec, 72° pendant 1 min et une dernière étape d'élongation à 72° pendant 10 min. Le deuxième programme, utilisé pour l'amplification du gène *fbaA* d'*Arsenophonus*, comprend une première étape de dénaturation à 95°C pendant 2 min, suivie par 30 cycles à 94° pendant 30 sec, 56°C pendant 30 sec, 72° pendant 1 min et une dernière étape d'élongation à 72° pendant 5 min. Après vérification d'un

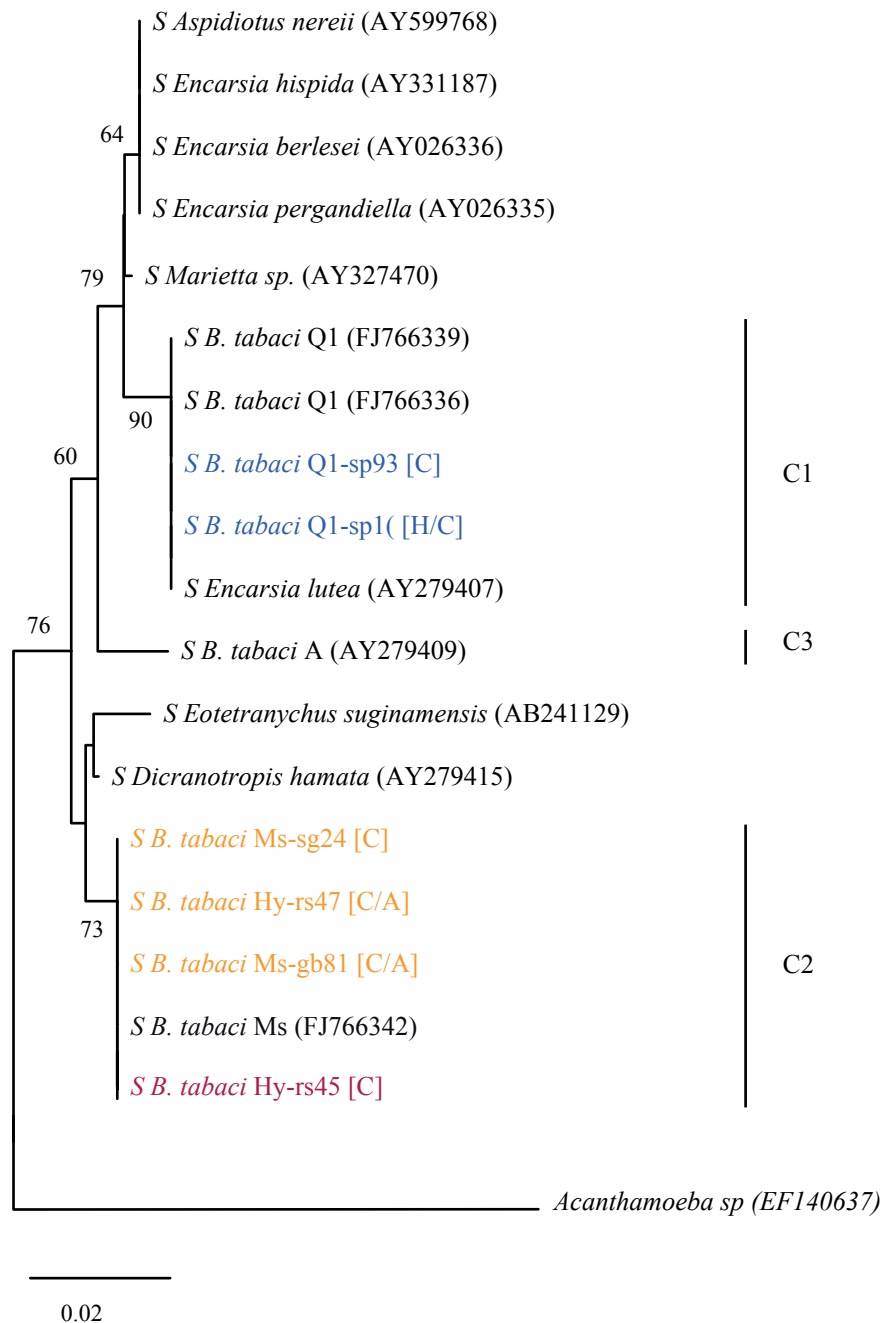


Figure 1. Phylogénie du gène de l'ADNr *16S* de *Cardinium* construite par la méthode de Maximum de Vraisemblance (« Maximum Likelihood ») implémentée dans le logiciel PhyML. Le modèle d'évolution GTR +G à été retenu par le logiciel ModelTest pour la construction de cet arbre. Les symbiotes ont le préfixe S, suivi du nom de l'hôte. Les séquences établies pour cette étude sont de couleurs différentes selon le biotype, suivies du biotype, du numéro d'échantillon et du statut d'infection entre crochets (H : *Hamiltonella* ; C : *Cardinium* ; A : *Arsenophonus*). Les séquences disponibles dans la banque de données GenBank sont en noir, suivies du numéro d'accèsion entre parenthèses. Les lettres C1 à C3 indiquent les clades des différentes souches détectées. Les nombres indiqués sur les branches représentent les valeurs de pourcentage de bootstrap calculées à partir de 1000 répliques. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées.

signal d'amplification sur gel d'agarose, les produits de PCR sont ensuite séquencés dans les deux sens (Macrogen Inc. sequencing service, Corée).

Tableau 2. Séquences des amorces utilisées pour les phylogénies des différents symbiotes détectés dans les populations de *B. tabaci* de La Réunion.

Gène et Symbiote	Séquences des amorces (5' vers 3')	Longueur (pb)	Références
<i>16S, Cardinium</i> CFB-F/CFB-R	GCGGTGTAAATGAGCGTG ACCTMTTCTTAAGCAAGCCT	~450	Weekset <i>et al.</i> , 2003
<i>16S, Rickettsia</i> Rb-F/Rb-R	GCTCAGAACGAACGCTATC GAAGGAAAGCATCTCTGC	~900	Gottlieb <i>et al.</i> , 2006
<i>16S, Hamiltonella</i> Hb-F/Hb-R	TGAGTAAAGTCTGGGAATCTGG AGTTCAAGACCGCAACCTC	~750	Zchori-Fein & Brown, 2002
<i>fbaA, Arsenophonus</i> <i>fbaA-F/fbaA-R</i>	GCYGCYAAAGTTCRTTCTCC CCWGAACCDCCRTGGAAAACAAAA	~600	Duron, 2010
<i>wsp, Wolbachia</i> 81-F/598-R	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC AAAAATTAAACGCTACTCCA	~600	Braig <i>et al.</i> , 1998

Analyses phylogénétiques

Les séquences de symbiotes produites lors de cette étude ainsi que des séquences disponibles dans la banque de données Genbank ont été alignées avec ClustalW (Thompson *et al.* 1994). Pour chaque alignement, le modèle optimal de substitution nucléotidique a été défini par le programme ModelTest (Posada 2006). Les arbres phylogénétiques ont été reconstruits selon la méthode de maximum de vraisemblance implémentée dans le logiciel PhyML (Guindon & Gascuel 2003). Les tests de robustesse des reconstructions phylogénétiques ont été effectués par la méthode de « *bootstrap* » avec 1000 répliques.

Résultats

La détection des symbiotes au sein des différents biotypes présents à La Réunion a montré que le biotype Q (groupe Q1) est infecté par *Hamiltonella* et *Cardinium*, le biotype Q (groupe Q2) par *Rickettsia*, *Wolbachia* et *Arsenophonus*, le biotype B par *Hamiltonella* et *Rickettsia* et le biotype Ms par *Rickettsia*, *Cardinium* et *Arsenophonus*. Dans chaque biotype la co-occurrence des symbiotes a été observée préalablement (voir Chapitres I et II).

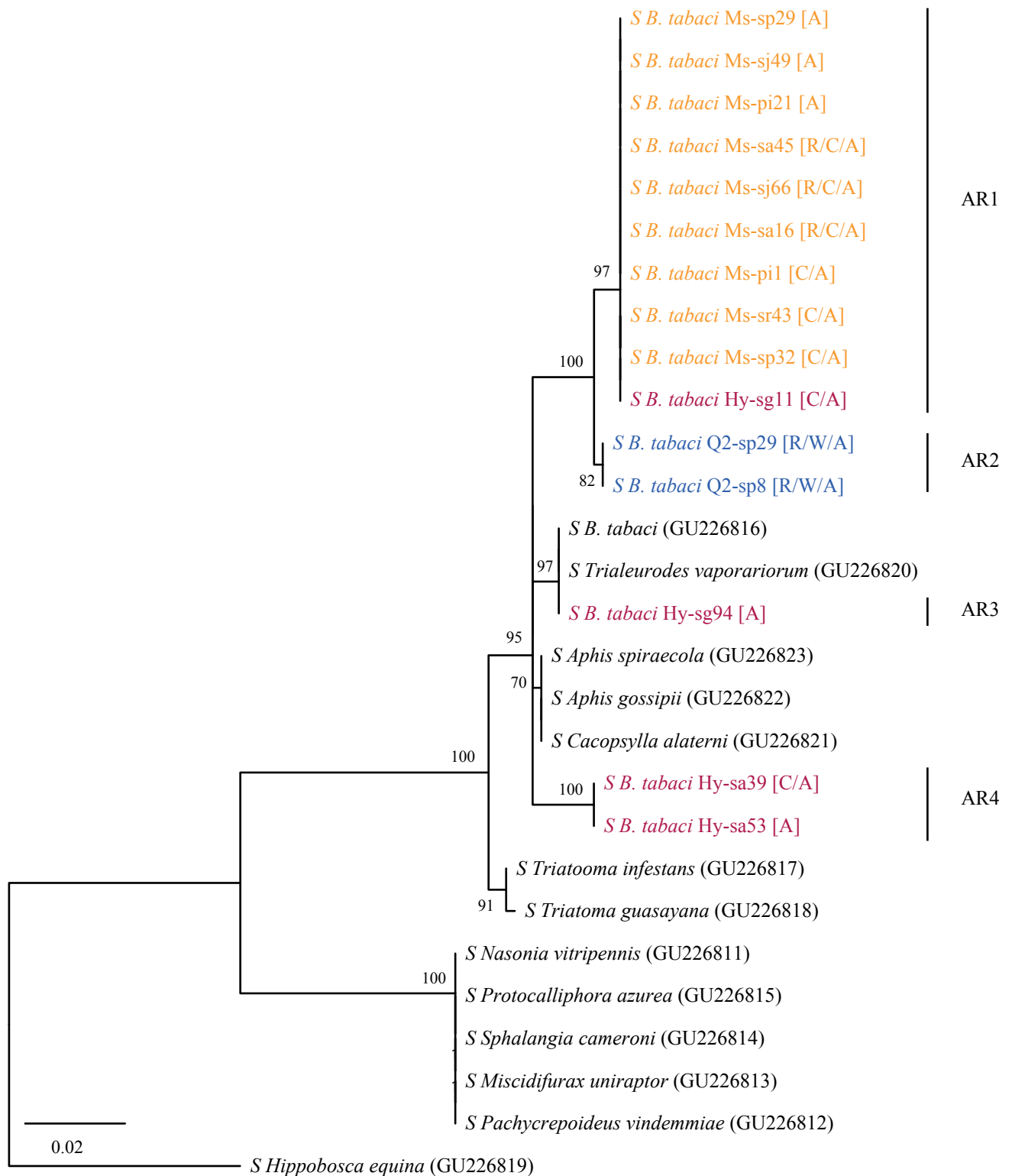


Figure 2. Phylogénie du gène *fbaA* d'*Arsenophonus* construite par la méthode de Maximum de Vraisemblance (« Maximum Likelihood ») implémentée dans le logiciel PhyML. Le modèle d'évolution GTR+G a été retenu par le logiciel ModelTest pour la construction de cet arbre. Les symbiotes ont le préfixe S, suivi du nom de l'hôte. Les séquences établies pour cette étude sont de couleurs différentes selon le biotype, suivies du biotype, du numéro d'échantillon et du statut d'infection entre crochets (R : *Rickettsia*, C : *Cardinium* ; A : *Arsenophonus*, W : *Wolbachia*). Les séquences disponibles dans la banque de données GenBank sont en noir, suivies du numéro d'accèsion entre parenthèses. Les lettres AR1 à AR4 indiquent les clades des différentes souches détectées. Les nombres indiqués sur les branches représentent les valeurs de pourcentage de bootstrap calculées à partir de 1000 répliques. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées.

Les analyses des séquences des symbiotes ont permis de mettre en évidence l'existence de deux souches différentes de *Cardinium*, une seule souche de *Rickettsia*, *Wolbachia* et *Hamiltonella* sur les gènes ciblés. Quatre souches différentes selon la phylogénie du gène *fbaA* ont pu être mises en évidence.

Dans le cas des bactéries, composées de plusieurs souches, au moins une séquence par biotype ou population et par statut d'infection a été utilisée pour les reconstructions phylogénétiques. Dans le cas des symbiotes composés d'une seule souche, une séquence par biotype et par statut d'infection a été retenue pour les reconstructions phylogénétiques. Le modèle de substitution nucléotidique GTR+G (« General Time Reversible model » + distribution gamma) a été retenu comme le plus vraisemblable selon les critères AIC implémenté dans ModelTest pour ces phylogénies.

La phylogénie du gène *16S* de *Cardinium* a été reconstruite par une matrice de 379 pb à l'aide de 2 séquences provenant du biotype Q (groupe Q1), 2 du biotype Ms et 2 d'individus hybrides entre B et Ms ainsi que 13 séquences issues de la littérature (Figure 1). Deux souches de *Cardinium* ont été décelées dans les populations de *B. tabaci* à La Réunion et confirment la description des souches C1 et C2 par Gueguen *et al.* (2010). La souche particulière au biotype Q (groupe Q1) est identique entre les deux statuts d'infection et identique à 100% à celle qu'héberge le parasitoïde *Encarsia lutea*, et forment un groupe monophylétique soutenu à 90% par les valeurs de bootstraps avec trois autres espèces d'*Encarsia*. La deuxième souche de *Cardinium* mise en évidence forme un clade soutenu à 73% avec des séquences qui proviennent d'individus de *B. tabaci* de biotype Ms (mono-infectés ou bi-infectés avec *Arsenophonus*) et d'individus hybrides (mono-infectés ou bi-infectés avec *Arsenophonus*) et représentent la souche C2. Une troisième souche, que nous n'avons pas décelée dans notre échantillonnage à La Réunion, a été retrouvée infectant un individu du biotype A.

La phylogénie du gène *fbaA* d'*Arsenophonus* a été reconstruite par une matrice de 575 pb à l'aide d'un total de 15 séquences dont 2 provenant du biotype Q (groupe Q2), 9 du biotype Ms et 4 d'individus hybrides entre les biotypes B et Ms ainsi que de 12 séquences issues de la littérature (Figure 2). Quatre souches différentes d'*Arsenophonus* ont été mises en évidence et ont été nommées AR1 à AR4 afin de les différencier avec les souches A1 à A4 décrites par Guéguen *et al.* (2010) à partir du gène *23S*. La première souche (AR1) regroupe toutes les

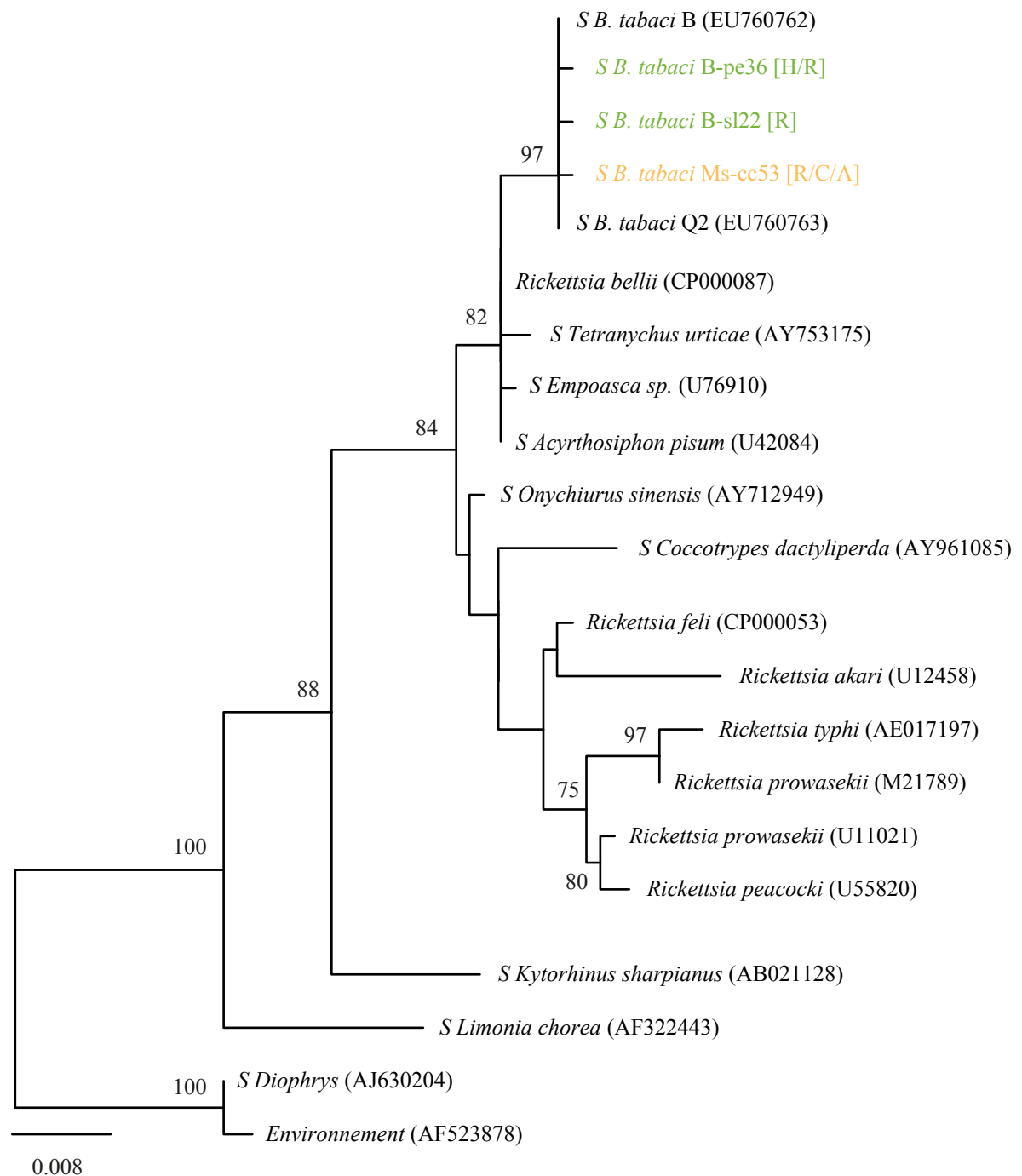


Figure 3. Phylogénie du gène de l'ADNr *16S* de *Rickettsia* construite par la méthode de Maximum de Vraisemblance (« Maximum Likelihood ») implémentée dans le logiciel PhyML. Le modèle d'évolution GTR +G a été retenu par le logiciel ModelTest pour la construction de cet arbre. Les symbiotes ont le préfixe S, suivi du nom de l'hôte. Les séquences établies pour cette étude sont de couleurs différentes selon le biotype, suivies du biotype, du numéro d'échantillon et du statut d'infection entre crochets (H : *Hamiltonella* ; R : *Rickettsia*, C : *Cardinium* ; A : *Arsenophonus*). Les séquences disponibles dans la banque de données GenBank sont en noir, suivies du numéro d'accèsion entre parenthèses. Les nombres indiqués sur les branches représentent les valeurs de pourcentage de bootstrap calculées à partir de 1000 répliques. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées.

séquences provenant des individus du biotype Ms infectés par *Arsenophonus* seul ou en co-occurrence avec *Cardinium* et/ ou *Rickettsia* ainsi qu'une séquence d'un individu hybride infecté par *Cardinium* et *Arsenophonus*. Ce clade, supporté à 97% est monophylétique avec un clade sœur regroupant des séquences d'*Arsenophonus* provenant d'individus du biotype Q (groupe Q2) et représentant la deuxième souche d'*Arsenophonus* (AR2). La troisième souche (AR3) d'*Arsenophonus* provenant d'un individu hybride mono-infecté est à 100% identique à celle séquencée chez *Trialeurodes vaporariorum* et chez un autre spécimen de *B. tabaci*. Enfin la quatrième souche (AR3) regroupe deux individus hybrides, l'un mono-infecté par *Arsenophonus* et l'autre co-infecté avec *Cardinium*.

La phylogénie du gène *16S* de *Rickettsia* a été reconstruite avec une matrice de 880 pb à l'aide de deux séquences provenant du biotype B, et d'une séquence provenant du biotype Ms. L'amplification du gène du 16S chez les individus du biotype Q (groupe Q2) a échoué, nous n'avons donc pas pu l'utiliser dans cette phylogénie et du biotype B ainsi que de 16 séquences issues de la littérature (Figure 3). Une seule souche de *Rickettsia* a été mise en évidence dans cette phylogénie, regroupant les séquences provenant de trois biotypes différents de *B. tabaci*. Ces souches forment un groupe monophylétique soutenu à 82% avec trois insectes phytophages (*Tetranychus urticae*, *Empoasca sp.*, *Acyrtosiphon pisum*) et *Rickettsia bellii*, symbiote présent chez les tiques hématophages.

La phylogénie du gène *16S* de *Wolbachia* a été reconstruite avec une matrice de 500 pb à l'aide de deux séquences provenant du biotype Q (groupe Q1), les biotypes B et Ms n'hébergeant pas cette bactérie, ainsi que de séquences issues de la littérature (Figure 4). Les séquences de *Wolbachia* de *B. tabaci* appartiennent toutes au même clade composé de séquences de la souche B de *Wolbachia*, une des huit souches de *Wolbachia* reconnues à ce jour (Lo, 2007).

La phylogénie du gène *16S* d'*Hamiltonella* a été reconstruite par une matrice de 700pb avec une séquence du biotype Q et deux séquences du biotype B ainsi que les quelques séquences disponibles dans la littérature pour ce gène (Figure 5).

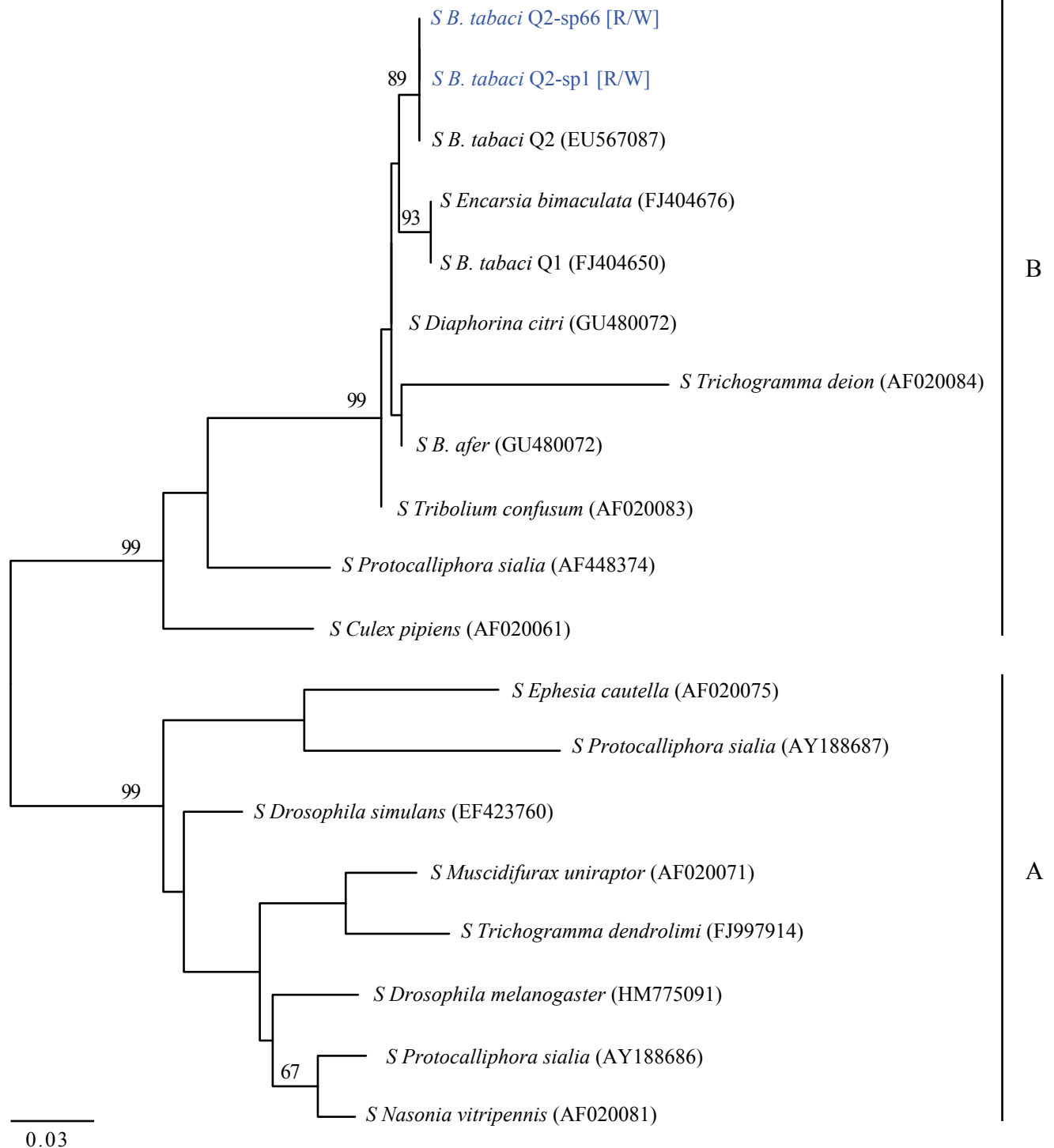


Figure 4. Phylogénie du gène *wsp* de *Wolbachia* construite par la méthode de Maximum de Vraisemblance (« Maximum Likelihood ») implémentée dans le logiciel PhyML. Le modèle d'évolution GTR+G a été retenu par le logiciel ModelTest pour la construction de cet arbre. Les symbiotes ont le préfixe S, suivi du nom de l'hôte. Les séquences établies pour cette étude sont en couleur, suivies du biotype, du numéro d'échantillon et du statut d'infection entre crochets (R : *Rickettsia* ; W : *Wolbachia*). Les séquences disponibles dans la banque de données GenBank sont en noir, suivies du numéro d'accèsion entre parenthèses. Les lettres A et B indiquent les clades des différentes souches. Les nombres indiqués sur les branches représentent les valeurs de pourcentage de bootstrap calculées à partir de 1000 réplifications. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées.

Discussion

Dans les populations de La Réunion, cinq des six bactéries infectant *B. tabaci* et répertoriées dans la littérature sont présentes, à l'exception de *Fritschea*. Outre la diversité du cortège symbiotique déjà décrite chez les populations de *B. tabaci* à La Réunion (voir Chapitres I et II), cette étude montre qu'il existe aussi une diversité au sein d'une même bactérie entre les biotypes et au sein d'un même biotype. C'est le cas pour *Arsenophonus* qui, selon la phylogénie du gène *fbaA*, compte quatre souches différentes (AR1 à AR4), une particulière au biotype Q (groupe 2), une souche au sein du biotype Ms et étonnamment trois souches au sein de la population hybride, dont une identique à celle de *Trialeurodes vaporariorum*.

La diversité des séquences d'*Arsenophonus* et leur distribution dans différents clades pourrait être le signe de transferts horizontaux et/ou de multiples acquisitions et peut être de co-infection d'un même individu par plusieurs souches. Des preuves phylogénétiques et expérimentales expliquant cette diversité ont été établies pour cette bactérie. Duron *et al* (2010) ont montré expérimentalement et avec des données de terrain que les transferts horizontaux d'*Arsenophonus* entre les espèces de parasitoïdes *Nasonia vitripennis* et *N. giraulti* étaient fréquents (12%). L'étude de Novakova *et al* (Novakova *et al.* 2009) a montré que le clade d'*Arsenophonus* est représenté par des bactéries provenant de taxons d'insectes phylogénétiquement éloignés et provenant même de bactéries isolées de plantes, signes que les transferts horizontaux et/ou les acquisitions multiples de cette bactérie ont lieu. Les infections multiples d'un même individu par plusieurs souches d'une même bactérie ne sont pas rares, notamment chez *Wolbachia* (Dedeine *et al.* 2004; Vautrin *et al.* 2007). Duron *et al* (2008a) ont également trouvé un hyménoptère (*Polistes nimpha*) co-infecté par deux souches d'*Arsenophonus*.

La phylogénie du *16S* de *Cardinium* corrobore les données de Gueguen *et al.* (2010) et montre qu'il existe des souches particulières aux différents biotypes infectés par cette bactérie. De nouveau, le fait que des souches de *Cardinium* présentes chez le biotype Q (groupe Q1) et le biotype A de *B. tabaci*, et chez le parasitoïde du genre *Encarsia*, se regroupent dans le même clade indiquerait des transferts horizontaux entre ces groupes d'insectes. Cette hypothèse, également basée sur des données phylogénétiques concernant une quinzaine d'espèces d'arthropodes, a déjà été émise (Weeks *et al.* 2003) et semblerait assez

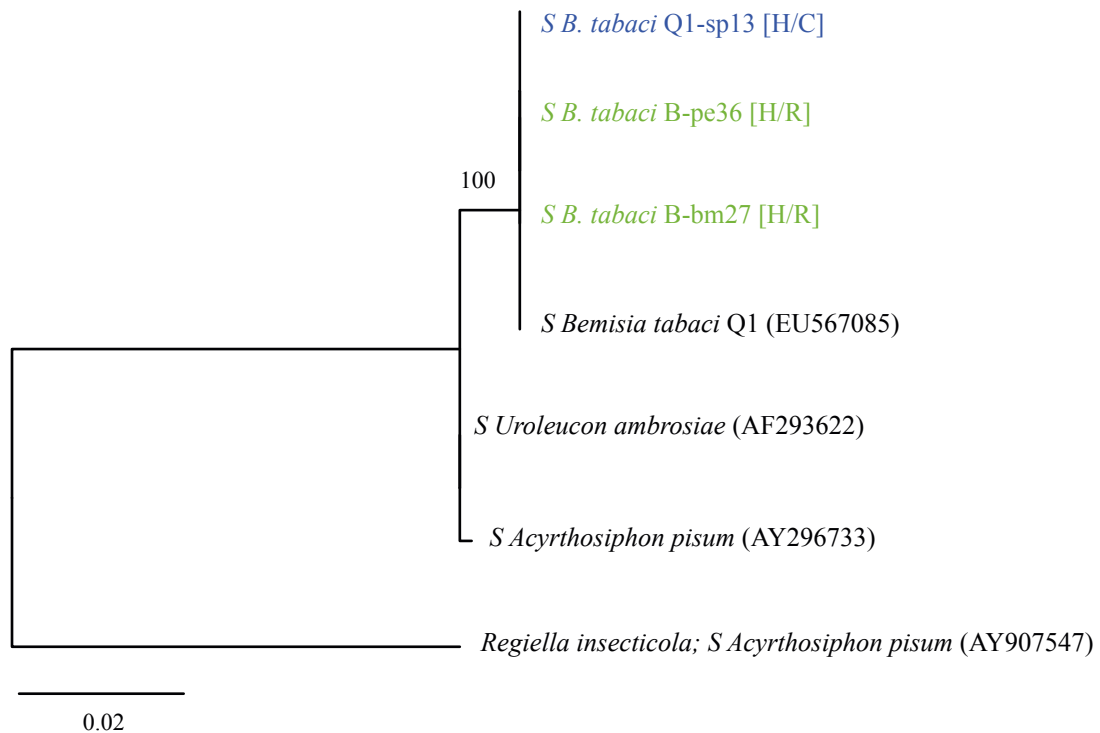


Figure 5. Phylogénie du gène de l'ADNr *16S* d' *Hamiltonella* construite par la méthode de Maximum de Vraisemblance (« Maximum Likelihood ») implémentée dans le logiciel PhyML. Le modèle d'évolution GTR +G a été retenu par le logiciel ModelTest pour la construction de cet arbre. Les symbiotes ont le préfixe S, suivi du nom de l'hôte. Les séquences établies pour cette étude sont de couleurs différentes selon le biotype, suivies du biotype, du numéro d'échantillon et du statut d'infection entre crochets (R : *Rickettsia*, C : *Cardinium* ; A : *Arsenophonus*, W : *Wolbachia*). Les séquences disponibles dans la banque de données GenBank sont en noir, suivies du numéro d'accèsion entre parenthèses. Les nombres indiqués sur les branches représentent les valeurs de pourcentage de bootstrap calculées à partir de 1000 répliques. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées.

probable puisque *B. tabaci* est l'hôte principal de nombreuses espèces d'*Encarsia* (Hunter & Woolley 2001) et que la transmission de symbiotes entre un parasitoïde et son hôte a déjà été démontré (Vavre *et al.* 1999; Heath *et al.* 1999).

La phylogénie du gène *wsp* de *Wolbachia* ne montre pas de diversité dans nos séquences provenant du biotype Q (groupe Q2), une seule séquence est présente à La Réunion. Il a été montré que le biotype Q (groupe Q1) pouvait être infecté par *Hamiltonella* et *Wolbachia* en co-infection et que cette souche de *Wolbachia* était différente de celle décelée chez le biotype Q (groupe Q2). La population du biotype Q introduite récemment à La Réunion (voir Chapitre I) (groupes Q1 et Q2), n'est présente que sur un seul site (Saint Pierre) et uniquement sur plante cultivée. Cette population est probablement issue d'un pool restreint d'individus et ne représente donc pas la totalité de la diversité présente chez le biotype Q. C'est probablement la raison pour laquelle nous n'avons pas décelé cette autre souche de *Wolbachia*. Des études précédentes montrent une très grande diversité entre les biotypes, au sein d'un même biotype ainsi qu'au sein d'individus (Nirgianaki *et al.* 2003; Ahmed *et al.* 2010), révélant de multiples événements d'acquisition par transfert horizontal.

Contrairement à la diversité génétique trouvée chez *Arsenophonus* et *Cardinium*, la phylogénie de *Rickettsia* ne montre aucune diversité au sein des différents biotypes infectés par cette bactérie (biotype B, Ms, et Q). Ce résultat confirme la phylogénie effectuée avec les gènes *gltA* et *scal* par les études de Gueguen *et al.* (2009; 2010) et qui montrent l'existence d'une seule séquence de *Rickettsia* entre les biotypes infectés. Cette faible diversité reflète probablement un événement récent d'infection par transfert horizontal. Comme il l'a été proposé par Chiel *et al.* (2009b) la transmission horizontale de *Rickettsia* aurait pu se faire via des parasitoïdes de *B. tabaci* ou encore via la plante (Zchori-Fein 2010). En effet, un exemple d'acquisition de *Rickettsia* via la plante a été décrit chez *Empoasca sp.* (Davis *et al.* 1998). Cette souche de *Rickettsia* trouvée chez cet insecte est une *Rickettsia* responsable d'une maladie sur Papayer, c'est la seule *Rickettsia* connue comme pathogène de plante (Perlman *et al.* 2006). Cet insecte se nourrissant sur papayer, aurait été infecté par celle-ci.

En ce qui concerne *Hamiltonella*, la phylogénie *16S* réalisée dans cette étude ainsi que celle réalisée sur le gène *gyrB* (Gueguen *et al.* 2010), ne montre aucune variabilité au sein des biotypes de *B. tabaci* infectés, pouvant également révéler des événements de transferts horizontaux récents, bien que ce mécanisme de transmission n'ait jamais été montré pour cette bactérie.

Ainsi les multiples infections par différentes bactéries entre les biotypes, au sein d'un même biotype ainsi que la présence de plusieurs souches différentes d'*Arsenophonus* et de *Cardinium* à La Réunion révèlent la complexité des voies de transmission et de l'histoire évolutive de ces bactéries chez leur hôte. Les événements de transfert horizontaux ne semblent pas rares, et les co-infections de plusieurs souches d'une même bactérie semblent possibles.

***Chapitre IV. Évolution temporelle de
l'isolement reproducteur entre deux
biotypes de Bemisia tabaci***

Introduction

Lorsque deux espèces proches, précédemment isolées géographiquement, se retrouvent lors d'un second contact, plusieurs issues sont possibles dont *i*) l'homogénéisation des deux populations grâce aux flux de gènes ; *ii*) le maintien de conditions stables d'un faible taux d'hybridation ; *iii*) l'élimination d'une des deux espèces et *iv*) la mise en place de barrières d'isolement qui les empêcheront de se croiser à nouveau. Dans le cas où de fortes barrières aux flux de gènes se mettent en place, un isolement reproducteur entre ces espèces peut alors apparaître. Ces barrières peuvent être de type prézygotique et/ou postzygotique (Dobzhansky 1970). Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale de ce manuscrit, les barrières prézygotiques peuvent être de nature écologique, comme par exemple l'isolement dû à des différences d'habitats occupés ou de ressources exploitées par des espèces différentes.

Dans le premier cas, chez les insectes phytophages, de la préférence pour des plantes hôtes différentes peut provoquer un isolement reproducteur partiel entre les populations d'insectes qui s'accouplent sur la plante dont ils se nourrissent (Feder *et al.* 1994; Via 1999).

Suite à un second contact entre espèces proches, les accouplements peuvent avoir lieu. Des barrières postzygotiques peuvent alors conduire à une faible valeur sélective des hybrides formés, due par exemple à leur mauvaise adaptation à l'habitat ou à des interactions épistatiques négatives entre les génotypes parentaux (nucléaires et/ou cytoplasmiques, voir Introduction de ce manuscrit).

L'insecte phytophage *Bemisia tabaci* est composé de nombreux groupes génétiques différents (voir Introduction générale) ; entités taxonomiques que l'on ne peut différencier morphologiquement et qui possèdent des caractéristiques écologiques, biologiques, comportementales et génétiques différentes (Perring 2001; De Barro *et al.* 2010).

Deux de ces groupes génétiques, connus comme les biotypes B et Q, sont invasifs dans le monde et lors d'une nouvelle introduction dans une zone qui héberge un biotype indigène, certaines études ont observé le déplacement compétitif du biotype indigène par le biotype invasif (voir Introduction générale), résultat dans certains cas d'interférences d'accouplement entre les deux biotypes (Liu *et al.* 2007). Dans ces cas, le déplacement compétitif par

interférence d'accouplement agit donc comme une barrière prézygotique aux flux de gènes entre les biotypes.

Toutefois dans le cas où deux biotypes peuvent s'accoupler (Delatte *et al.* 2006) et avoir une descendance fertile (voir Chapitre II) comme c'est le cas pour les biotypes B et Ms à La Réunion, les interactions qui se mettent en place n'ont été que très peu documentées et seulement dans le cas de populations de laboratoire.

A la Réunion, le biotype B de *B. tabaci* a été introduit à la fin des années 90 (Delatte *et al.* 2005), déjà colonisée par le biotype indigène Ms. On retrouve ces deux biotypes en 2006 (voir Chapitre II), et lors de notre dernier échantillonnage de 2010 (Bile 2010). Depuis 2010, le biotype Q a également été introduit à La Réunion (voir Chapitre I). Ces trois biotypes se retrouvent donc lors d'un second contact après avoir évolué en allopatrie suffisamment longtemps pour être différenciés génétiquement.

Sur l'île de la Réunion, l'introduction du biotype B à la fin des années 90, la présence d'un biotype indigène Ms et le suivi de ces populations au cours de neuf années d'échantillonnage, tant d'un point de vue écologique (habitat), biologique (fréquences endosymbiotiques) et génétique (composition en hybrides) offre une opportunité d'étudier l'évolution de ces paramètres sur le terrain, afin de mieux comprendre la coexistence de ces deux biotypes dans le temps.

Matériel et méthode

Échantillonnage

Les adultes de *B. tabaci* ont été récoltés au cours de cinq campagnes d'échantillonnage sur l'île de La Réunion entre 2001 et 2010. Les trois premières campagnes ont été effectuées en février 2001 (S1), en octobre 2001 (S2) et en février 2002 (S3) (Delatte 2006). La quatrième campagne a eu lieu en février 2006 (S4) (voir Chapitre II) et la cinquième en février 2010 (S5) (Bile 2010). Les adultes ont été récoltés sur deux types d'habitat ; i) l'habitat de type « cultivé » : la tomate (*Lycopersicon esculentum*), l'aubergine (*Solanum melongena*), la courgette (*Cucurbita pepo*), la patate douce (*Ipomoea batatas*), le haricot (*Vigna sp.*), le chou (*Brassica oleracea*), le manioc (*Manihot esculenta*) et la pastèque (*Cucurbita sp.*) et ii) l'habitat de type « adventice » : l'euphorbe (*Euphorbia heterophylla*), le poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* L.), le Jean-Robert (*Euphorbia hirta* L.), le lantana (*Lantana camara* L.), le Datura (*Datura sp.*) et l'Ipomée (*Ipomea maxima*). Les sites échantillonnés se localisent sur le pourtour de l'île. Les régions sud et est sont les plus enclines aux précipitations (voir Figure 12 du Chapitre I), l'est étant surtout une région de culture de la canne à sucre. L'ouest et le nord sont des régions beaucoup plus sèches et représentent majoritairement les zones de maraîchage (particulièrement la zone sud-ouest (Reynaud *et al.* 2003)).

Nous précisons ici, l'échantillonnage de février 2010 qui n'a pas été détaillé auparavant dans ce manuscrit. Celui-ci a été effectué sur sept sites (Figure 1) : Saint Pierre, Etang-salé, Saint Gilles, Saint André, Sainte Rose, Saint Joseph et Petite île. Sur chacun de ces sites, et comme pour les autres périodes d'échantillonnage S1 à S4, les adultes de *B. tabaci* ont été récoltés sur habitats de type adventice et cultivé.

Détermination des biotypes et des individus hybrides

L'ADN de chaque individu est extrait suivant le protocole utilisé dans les chapitres I et II. La détermination des biotypes et des individus hybrides au cours des échantillonnages S1, S2, S3 s'est fait à l'aide de huit marqueurs microsatellites : P7, P62, P53, P41, P32, P5, P11 et P59 (Delatte *et al.* 2006). En ce qui concerne les échantillons de 2006 et 2010, deux autres marqueurs ont été ajoutés : Bem25 (De Barro *et al.* 2003) et Ms145 (Dalmon *et al.* 2008). Cependant, afin de comparer les différentes dates d'échantillonnage, seuls les huit marqueurs analysés en 2001 ont été utilisés pour analyser les populations de 2006 et 2010.

Les techniques de génotypage employées sont identiques à celles employées dans les chapitres I et II. Pour chaque jeu de données (S1 à S5), la méthode de regroupement (*clustering*) est mise en œuvre dans le logiciel STRUCTURE version 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) et est fondée sur des probabilités bayésiennes. Cette méthode, détaillée dans le chapitre II, permet la différenciation et l'identification des biotypes et de leurs hybrides. Pour chaque individu, une probabilité d'appartenance à chaque population permet l'assignation à un des deux biotypes ou l'assignation aux hybrides. Nous avons choisi un seuil de probabilités comprises entre 0 et 0.1 et entre 0.9 et 1 pour identifier les individus de biotype B et Ms respectivement. Nous avons choisi un seuil de probabilités compris entre 0.4 et 0.6 à des individus hybrides de première génération F1. Enfin, les hybrides de générations n ($n > 1$) sont associés aux probabilités d'assignation suivantes : entre 0.1 et 0.4 pour un fond génétique majoritaire B, et entre 0.6 et 0.9 pour un fond majoritaire Ms.

Détection des endosymbiotes secondaires

Le statut d'infection de chaque individu est déterminé par une PCR multiplex ayant pour cible les endosymbiotes *Wolbachia*, *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Cardinium* et *Rickettsia*. La technique de détection employée est décrite dans le chapitre II.

Analyses statistiques

Afin d'étudier la préférence d'habitat des biotypes B et Ms au cours du temps, l'évolution de la répartition des biotypes sur les habitats de type cultivé et adventice au cours du temps a été analysé en étudiant d'une part la fréquence relative des types d'habitat (cultivé et adventice) colonisé par chacun des biotypes B et Ms étudiés indépendamment, et inversement la répartition des biotypes (B ou Ms) au sein de chaque type d'habitat (cultivée ou adventice). L'hypothèse nulle selon laquelle les fréquences relatives dans les différents groupes sont égales est vérifiée grâce à un test d'égalité des proportions effectué sous R (R Development Core Team 2009).

L'analyse des fréquences des hybrides F1 est effectuée au cours du temps (entre S1 et S5) dans les sites colonisés par les deux biotypes selon chaque type d'habitat. Pour chaque habitat la fréquence attendue des hybrides est calculée selon la proportion de B, d'hybrides F1 et de Ms observée, selon la loi de Hardy-Weinberg. Ces proportions attendues sont comparées aux

effectifs observés sur les populations de terrain grâce à un test exact d'égalité des proportions, à l'aide du logiciel R (R Development Core Team 2009).

Nous avons également analysé l'évolution des fréquences d'infection symbiotique dans les deux biotypes entre 2006 (S4) et 2010 (S5).

Résultats

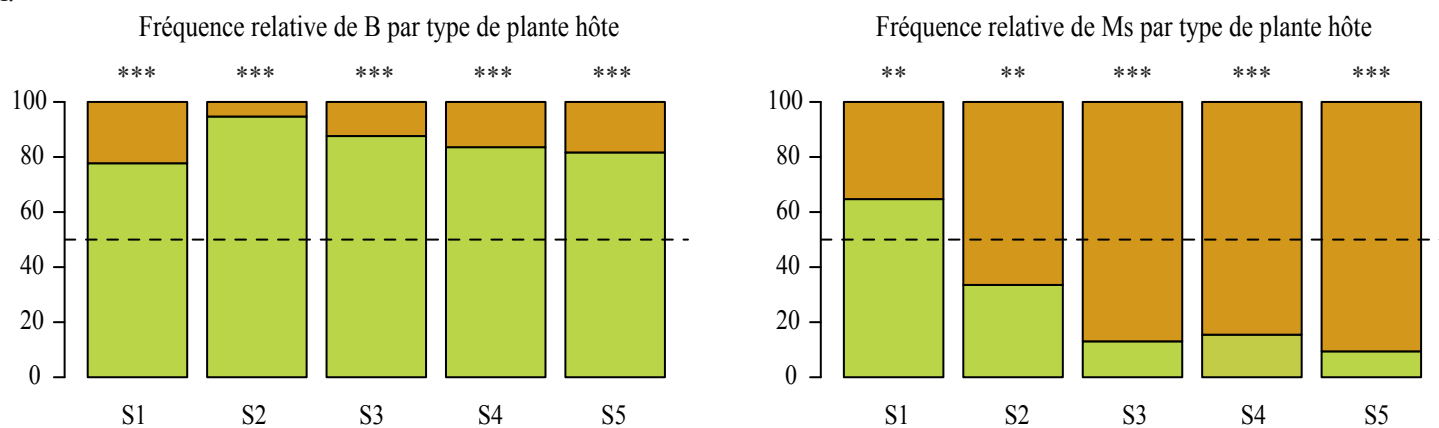
Répartition des biotypes sur les habitats cultivés et adventices

Les échantillonnages effectués en février 2001 (S1), octobre 2001 (S2), février 2002 (S3), février 2006 (S4) et février 2010 (S5) ont permis d'analyser respectivement 208, 201, 157, 1041 et 795 adultes de *B. tabaci*. Les échantillons ont été collectés à la fois sur habitat de type cultivé et adventice (voir Delatte *et al.* (2006) pour l'échantillonnage de 2001-2002, Chapitre II pour l'échantillonnage de 2006).

Pour l'échantillonnage de 2010 (Figure 1), tous les habitats de type cultivé sont constitués par des cultures d'aubergine (grandes parcelles), excepté sur le site de Petite île, constitué d'une petite parcelle de haricot. L'habitat adventice est constitué uniquement d'euphorbes (*Euphorbia heterophylla*) pour tous les sites. Sainte Rose représente le seul site où aucun habitat cultivé n'a été trouvé ; l'habitat adventice est colonisé par une majorité d'individus de biotype Ms ($P < 0.001$). Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, le site de Saint Pierre sur habitat cultivé est colonisé uniquement par des individus de biotype Q. Sur ce même site, mais sur type adventice, une majorité d'individus de biotype Ms a été récoltée ($P < 0.001$). Sur les sites de Saint Gilles, Saint André et Saint Joseph, une majorité d'individus B a été récoltée sur habitat cultivé ($P < 0.001$) et une majorité d'individus Ms sur habitat adventice ($P < 0.001$). Sur le site de Petite île, les deux types d'habitat sont colonisés par des individus de biotype Ms ($P < 0.001$).

Les fréquences relatives des types d'habitats (cultivés ou adventices) sur lesquelles les individus de biotype B ou Ms ont été collectés, sont représentés dans la figure 2.A. Sur le diagramme de gauche, les résultats montrent que les individus de biotype B colonisent significativement plus l'habitat cultivé que l'habitat adventice, pour les cinq périodes d'échantillonnage ($P < 0.001$), avec une fréquence relative minimale de 77% en S1, et maximale de 95% en S2.

A.



B.

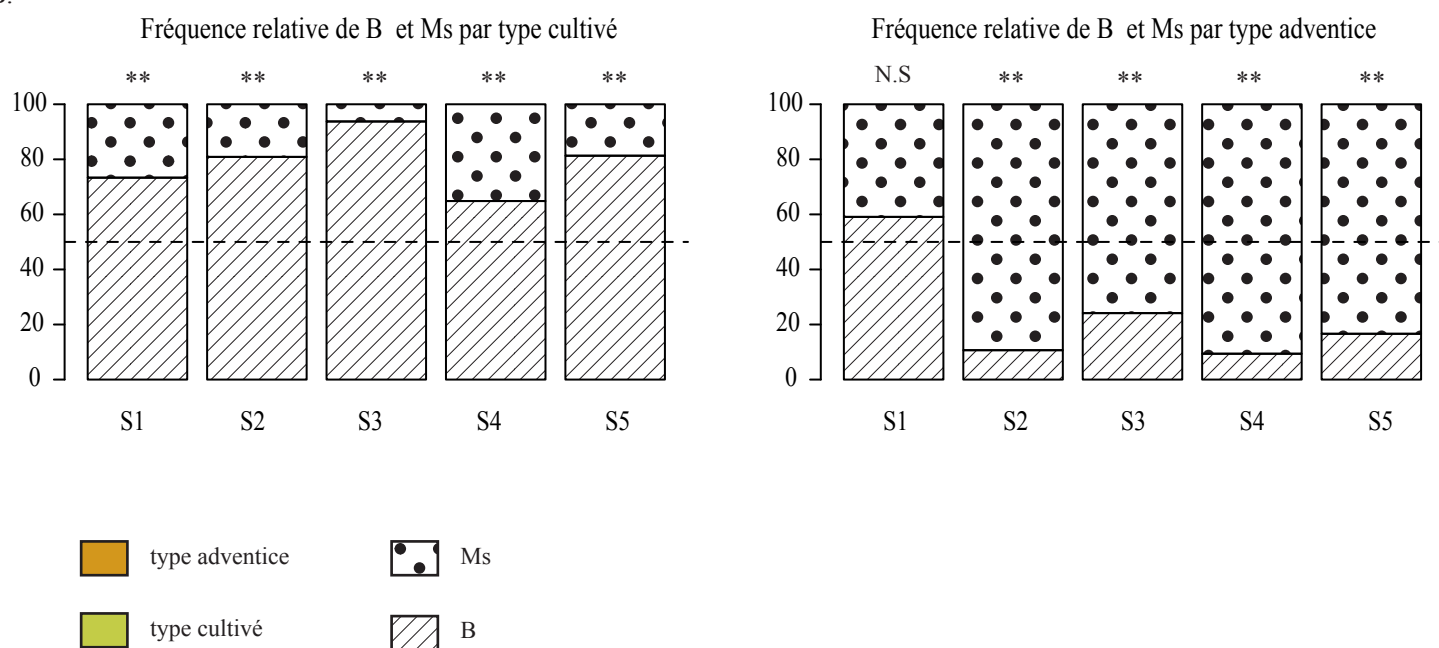


Figure 2. Fréquences relatives des biotypes B et Ms sur type de plante hôte cultivé et adventice en fonction des cinq campagnes d'échantillonnage (S1 : février 2001, S2 : octobre 2001, S3 : février 2002, S4 : février 2006, S5 : février 2010). La ligne en pointillé représente une fréquence relative de 50%. Les p-values des tests de proportions sont indiquées par: **< 0.01, ***< 0.001, N.S. non significatif.

En ce qui concerne les individus de biotype Ms, en S1, l'habitat de type cultivé est significativement plus colonisé (65%, $P < 0.01$) que l'habitat de type adventice. A partir de S2 jusqu'à S5, nous observons l'inverse : l'habitat de type adventice est significativement plus colonisé que l'habitat cultivé, variant de 66% pour S2 ($P < 0.01$) à 90% pour S5 ($P < 0.001$). En résumé, l'habitat de type cultivé est majoritaire pour B et Ms en S1. De S2 à S5, l'habitat cultivé est majoritaire pour B, alors que l'habitat adventice est majoritaire pour Ms.

Les fréquences relatives de B et de Ms (Figure 2.B.) montrent une répartition différentielle selon le type d'habitat colonisé. Au sein des cinq dates d'échantillonnage, le type cultivé héberge significativement plus d'individus de biotype B que d'individus de biotype Ms (entre 65% et 95%, $P < 0.01$). En revanche, sur le type adventice, la répartition de B et Ms est différente selon les années d'échantillonnage. Les fréquences relatives de B et Ms sont équivalentes pour S1 alors que pour les quatre autres dates d'échantillonnage, la fréquence relative de Ms par rapport à B est significativement plus importante avec des fréquences situées entre 75% et 90% ($P < 0.01$).

En résumé, la répartition des deux biotypes sur les habitats de type cultivé et adventice n'est pas aléatoire et change au cours du temps. En S1, l'habitat de type cultivé est préférentiel pour les deux biotypes, avec une prépondérance de B. À partir de S2, les Ms sont prépondérants sur l'habitat adventice, qui représente leur habitat préférentiel. Le biotype B, quant à lui, reste prépondérant sur l'habitat cultivé, qui constitue également son habitat préférentiel.

Evolution de la distribution des hybrides

Nous avons également observé la répartition des hybrides, en fonction du type d'habitat et de leur probabilité d'assignation aux biotypes B ou Ms. La figure 3 représente la distribution des probabilités d'assignations pour les échantillons récoltés dans l'habitat cultivé et dans l'habitat adventice au cours des cinq dates d'échantillonnage. Pour chacun de ces groupes, on observe une distribution bimodale, représentative des deux biotypes présents sur l'île. Entre 0.1 et 0.4, les hybrides possèdent un fond génétique majoritairement B et entre 0.6 et 0.9 les hybrides possèdent un fond génétique majoritairement Ms, révélant des backcross entre les hybrides et les parents B et Ms respectivement. Sur habitat cultivé, par exemple, une majorité significative de biotypes B s'accompagne d'une majorité d'hybrides de fond génétique B, de S1 à S5 ($P < 0.05$, à l'exception de S4).

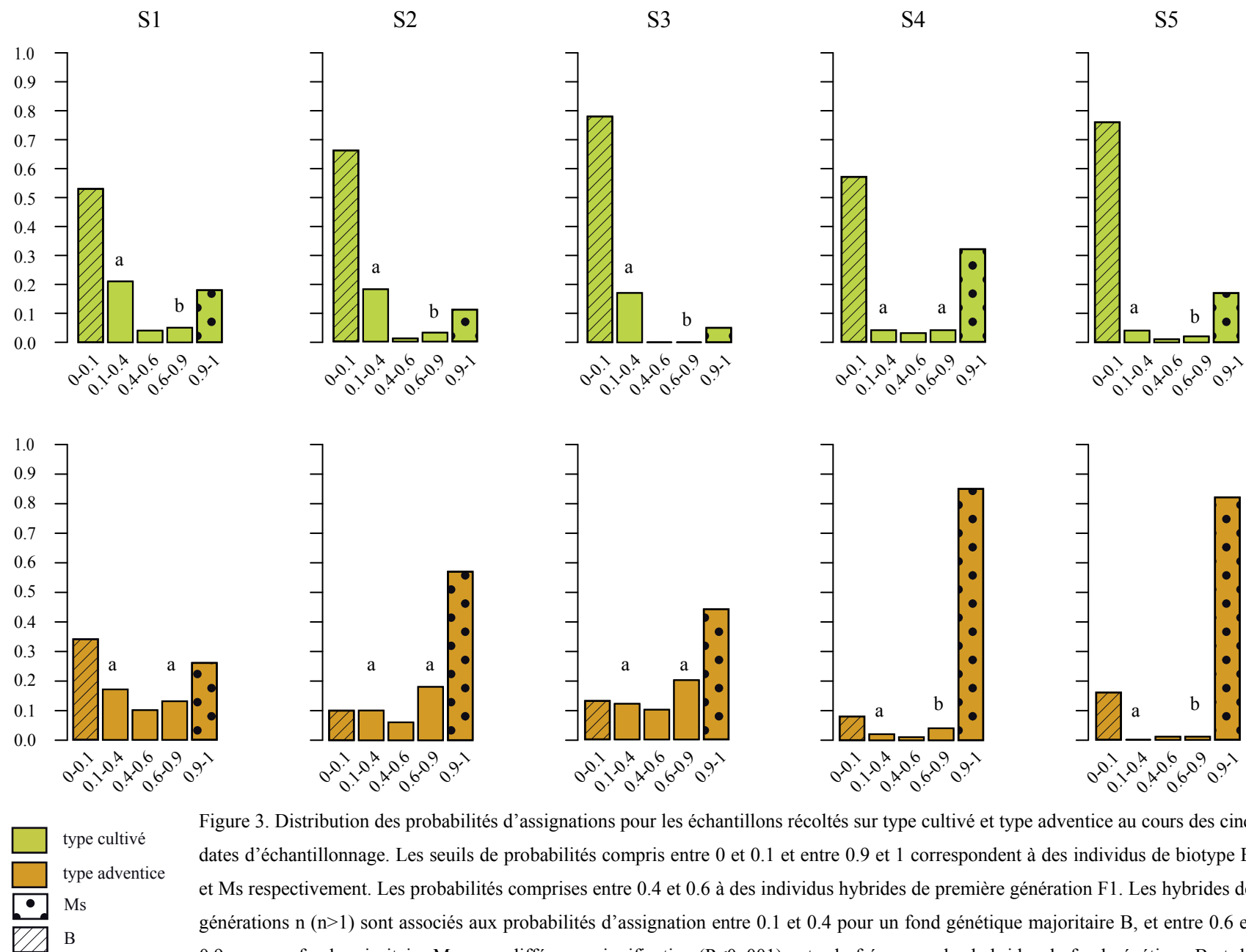


Figure 3. Distribution des probabilités d'assignations pour les échantillons récoltés sur type cultivé et type adventice au cours des cinq dates d'échantillonnage. Les seuils de probabilités compris entre 0 et 0.1 et entre 0.9 et 1 correspondent à des individus de biotype B et Ms respectivement. Les probabilités comprises entre 0.4 et 0.6 à des individus hybrides de première génération F1. Les hybrides de générations n ($n > 1$) sont associés aux probabilités d'assignation entre 0.1 et 0.4 pour un fond génétique majoritaire B, et entre 0.6 et 0.9 pour un fond majoritaire Ms ; une différence significative ($P < 0.001$) entre la fréquence des hybrides de fond génétique B et de fond génétique Ms est représenté par une lettre différente (a et b). Rappelons que la différence entre les fréquences de B et de Ms est toujours significative ($P < 0.001$), à l'exception de la période S1 sur plantes adventices (Figure 2B).

Sur habitat adventice, c'est seulement en S4 et en S5, lorsque la fréquence du biotype Ms est supérieure à 80% que les hybrides observés sont majoritairement de fond génétique Ms ($p < 0.05$). Précédemment, entre S1 et S3, les hybrides apparaissent plus fréquents qu'en S4 et S5 et n'ont pas de fond génétique préférentiel. Plus précisément, la fréquence de la totalité des hybrides (F1 et backcross) diminue au cours du temps quel que soit le type d'habitat. En effet, sur type cultivé, on observe une diminution significative de la fréquence d'hybrides de 29,7% pour S1 à 7,2% pour S5; sur type adventice, on observe également une diminution significative de la fréquence d'hybrides de 40,2% pour S1 à 2,3% pour S5.

Ainsi, la distribution des fréquences d'hybrides observés dépend en partie des fréquences relatives des parents, et du type d'habitat colonisé. Pour ces raisons, nous avons décidé, pour chaque période d'échantillonnage, de classer les différents sites d'échantillonnage où nous trouvons des hybrides, en catégories : habitats (adventices ou cultivées), et fréquences parentales ($B < Ms$, $B = Ms$ ou $B > Ms$). Pour chacun des sites considérés, nous avons ensuite calculé la fréquence d'hybrides attendus, à partir des fréquences de B, d'hybrides F1 et de Ms observés. Nous avons ensuite comparé la fréquence attendue, à celle observée. Les résultats sont schématisés dans le tableau 1 : pour un total de 58 sites, 26 sites comportent un nombre d'hybrides comparable aux hybrides attendus ($H_{obs} = H_{att}$), et 27 sites comportent un nombre d'hybrides inférieur aux hybrides attendus ($H_{obs} < H_{att}$).

Tableau 1. Sites d'échantillonnage pourvus d'hybrides F1, classés selon la période d'échantillonnage, le type d'habitat et la fréquence relative de B et de Ms. La fréquence des hybrides observée est soit égale ($H_{obs} = H_{att}$), soit inférieure à celle attendue ($H_{obs} < H_{att}$) pour chaque type d'habitat et pour chaque année d'échantillonnage, selon la fréquence relative de B et de Ms. La fréquence relative de B est significativement supérieure, inférieure ou égale à celle de Ms (test exact binomial, $P < 0.01$). L'égalité des proportions entre les hybrides observés et attendus est testé avec un test exact binomial ($P < 0.01$).

Période d'échantillonnage	Type d'habitat	Fréquence relative de B et Ms	Nbre sites: $H_{obs} = H_{att}$	Nbre sites: $H_{obs} < H_{att}$
S1	cultivé	$B > Ms$	1	0
	cultivé	$B = Ms$	2	2
	adventice	$B = Ms$	4	1
S2	cultivé	$B > Ms$	1	1
	cultivé	$Ms > B$	1	0
	cultivé	$B = Ms$	0	1
	adventice	$B = Ms$	5	1
S3	cultivé	$B = Ms$	0	1
	adventice	$Ms > B$	1	0
	adventice	$B = Ms$	2	0
S4	cultivé	$B > Ms$	1	3
	cultivé	$Ms > B$	0	1
	adventice	$B > Ms$	0	2
	adventice	$Ms > B$	7	5
S5	cultivé	$B > Ms$	0	3
	cultivé	$Ms > B$	0	1
	adventice	$B > Ms$	1	0
	adventice	$Ms > B$	0	4

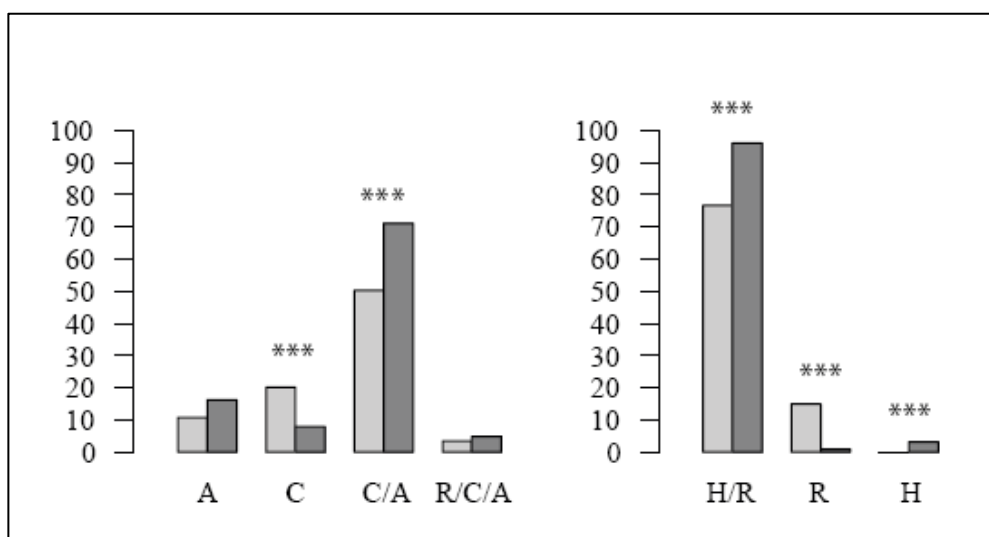


Figure 4. Evolution des fréquences d'infection des différentes combinaisons symbiotiques entre S4 (février 2006) et S5 (février 2010) chez les biotypes Ms (gauche) et B (droite). Les p-values des tests de proportion sont indiquées par: **< 0.01, ***< 0.001, N.S. non significatif.

Premièrement, on observe que les sites de fréquence relative B=Ms sur habitat adventice, qui sont représentés pour les périodes S1 à S3 réunies (intervalle de confiance à 95% : 32 à 74%), ne sont plus observés de S4 à S5 (intervalle de confiance à 95% : 0 à 12%). Ainsi, la diminution des sites de fréquence relative B=Ms est significative au cours du temps. Pour les autres, aucune différence significative n'a été observée. Deuxièmement, on observe que les seuls sites où les hybrides sont majoritairement de la classe Hobs=Hatt, c'est-à-dire aussi nombreux qu'attendus, sont de fréquence relative B=Ms, sur habitat adventice uniquement ($p < 0.05$). Troisièmement, pour la période S5, les sites sont significativement majoritaires pour la classe Hobs<Hatt. En d'autres termes, il n'y a pratiquement plus aucun site où les hybrides sont aussi nombreux qu'attendus. En résumé, les seuls sites où les hybrides sont aussi nombreux qu'attendus (B=Ms, habitat adventice) diminuent à partir de S4, et ce de manière significative. En parallèle, on note en S5 un nombre majoritaire ($p < 0.05$) de sites où les hybrides sont moins nombreux qu'attendus.

Evolution des fréquences d'infection symbiotique

Enfin, nous avons étendu la caractérisation des symbiotes des biotypes B et Ms, précédemment réalisée sur les échantillonnages de S4 (Chapitre II), à la période S5. L'évolution des fréquences d'infection entre les échantillonnages de 2006 et de 2010 pour les deux biotypes est représentée dans la figure 4.

Dans la population Ms, seules les fréquences d'infection par *Cardinium* (C) d'une part et par *Cardinium* et *Arsenophonus* (C/A) d'autre part ont significativement évolué entre 2006 et 2010. La fréquence d'infection de *Cardinium* diminue de 20% à 8% ($P < 0.001$) et celle de *Cardinium*/*Arsenophonus* augmente de 50% à 71% ($P < 0.001$). Globalement, entre 2006 et 2010, les fréquences d'*Arsenophonus* augmentent de 64.2% à 90% ($P < 0.001$) ainsi que celles de *Cardinium* de 73.6% à 81.4% ($P < 0.01$). Dans la population B, les fréquences d'infection par *Hamiltonella* et *Rickettsia* (H/R) ont significativement augmenté de 77% à 96% entre 2006 et 2010 ($P < 0.001$). Les fréquences d'infection par *Rickettsia* seul ont diminué de 15% à 1% ($P < 0.001$). Les infections par *Hamiltonella* seul, inexistantes en 2006, atteignent 3% en 2010 ($P < 0.001$). Globalement, entre 2006 et 2010, la fréquence d'infection d'*Hamiltonella* augmente de 78% à 98% ($P < 0.001$) et celle de *Rickettsia* reste autour de 90% ($P > 0.05$).

Discussion

Dans la région du sud ouest de l'océan indien, le biotype Ms est présent aux Seychelles, à Madagascar, à Mayotte et aux Comores où il est le seul biotype de *B. tabaci* (Delatte *et al.* 2005). En revanche, il cohabite en sympatrie avec le biotype B à l'île de la Réunion et à l'île Maurice. Sur les îles où le biotype Ms est seul, il a été observé sur des habitats de type cultivé (Delatte *et al.* *In Press*). En zone de sympatrie avec B, d'après les données d'échantillonnage récoltées en 2001-2002, le biotype Ms a tendance à être plus présent sur habitat adventice et le biotype B sur habitat cultivé (Delatte *et al.* 2006), ce qui pourrait constituer comme nous l'avons vu plus haut, une barrière écologique prézygotique aux flux de gènes entre ces biotypes.

Ségrégation d'habitat

Les résultats observés sur les fréquences de B et Ms par type d'habitat montrent que globalement les individus de biotype B se retrouvent significativement plus sur type cultivé que sur type adventice et ceci au cours des cinq dates d'échantillonnage. Le biotype Ms, quant à lui, se retrouve plus fréquemment sur type cultivé en 2001 (février), puis plus fréquemment sur type adventice pour les quatre dates d'échantillonnage suivantes. L'habitat de type adventice était colonisé par les deux biotypes en début 2001 et par la suite il est devenu majoritairement colonisé par le biotype Ms de 2002 à 2010. L'habitat de type cultivé reste, au cours du temps, majoritairement colonisé par des individus de biotype B. De plus, l'analyse des sites individuels permet de montrer, entre S1-S3 et S4-S5, une diminution significative, sur habitat adventice, du nombre de sites où B et Ms coexistent. Les résultats montrent donc que les deux biotypes occupaient le même habitat de type adventice à partir de la première période d'échantillonnage S1 (février 2001) et que, leurs préférences d'habitat se sont différenciées au cours du temps.

Il est intéressant de préciser le cas de deux sites pour les résultats obtenus en 2010. Au cours de cette période d'échantillonnage, il a été observé que le site où seul le biotype B est présent (site Etang Salé, voir Figure 1), les individus étaient présents sur les deux types d'habitat (cultivé et adventice) et ne montraient donc pas de préférence d'hôte entre un habitat cultivé et un habitat adventice.

Dans le cas du site de Petite Ile (où les individus ont été récoltés sur une parcelle de petite surface d'un particulier), les deux types d'habitat sont colonisés par une majorité d'individus de biotype Ms. Ce résultat semble présumer, que lorsqu'un des deux biotypes est minoritaire sur un site, le biotype majoritaire occupe les deux types d'habitat. En sympatrie, les deux biotypes mettraient en place des interactions d'évitement compétitif ou des interactions négatives directes (agressivité, interférences pour accès à la ressource...) pouvant provoquer un déplacement d'habitat (le biotype B sur type cultivé et le biotype Ms sur type adventice).

Ainsi, lorsque les deux biotypes sont présents sur un même site on observe aujourd'hui une répartition différentielle selon le type d'habitat. De plus, dans les habitats cultivé et adventice, il n'existe plus de sites où les biotypes B et Ms sont présents en proportions équivalentes. Cette préférence progressive entre habitats au cours du temps rend donc la rencontre entre ces deux biotypes de moins en moins probable et l'on s'attend donc à ce que la fréquence des hybrides diminue au cours du temps en fonction de la fréquence relative de B et Ms dans chaque habitat.

Diminution de la fréquence des hybrides

On peut en effet établir un lien entre la caractéristique des sites et la fréquence d'hybrides observés, avec une fréquence d'hybrides égale à celle attendue en des sites où B et Ms sont présents en proportions équivalentes dans l'habitat de type adventice. Ainsi, il existait probablement des sites, entre S1 et S3, où aucune barrière à la reproduction ne semble s'être mise en place. Au cours du temps, on constate la disparition de ces sites, une répartition globale différentielle de B et Ms sur habitat de type adventice et cultivé, et la diminution des hybrides observés. On peut ainsi supposer la mise en place de barrières prézygotiques spatiales qui semblent évoluer vers un isolement reproducteur entre les biotypes.

Ce phénomène pourrait être dû à des mécanismes de compétition pour la ressource, où les membres d'une population limitent ou refusent l'accès à la ressource des individus d'une autre population. Cette compétition par déplacement n'inclut pas obligatoirement l'élimination d'une des deux espèces, mais l'exclusion d'un micro-habitat ou d'une plante hôte particulière, comme cela a déjà été montré pour d'autres insectes polyphages (Reitz & Trumble 2002).

La récente introduction en 2010 du biotype Q à La Réunion, n'a pas encore pu nous permettre d'observer s'il existe des croisements viables avec les biotypes B et Ms déjà présents. Cependant, il a été observé en pullulation sur un seul site, dans un habitat de type cultivé (site Saint Pierre, voir Figure 1) et aucun individu du biotype B n'a été détecté, biotype pourtant présent partout ailleurs et en fréquence majoritaire sur type cultivé, durant les précédentes campagnes de terrain (voir Chapitre II et Delatte *et al.* (2006)). Toutefois, sur type adventice sur le même site il a été détecté, mais en très faible quantité (3 individus de biotype B et 4 individus de Q).

La préférence d'habitat de type cultivé du biotype B pourrait également être expliquée en partie par de meilleures performances du biotype B sur plante cultivée par rapport au biotype Ms. En effet, l'étude de Delatte *et al.* (2009a) montre que le biotype invasif B possède des traits biologiques avantageux par rapport au biotype indigène Ms sur la tomate en termes de croissance démographique (meilleur taux intrinsèque de croissance, temps de développement plus court et forte fécondité) et de compétition (plus grande taille des adultes et des descendants). Le biotype B est aussi connu pour sa capacité à développer des résistances à certains insecticides (Horowitz *et al.* 2003; Horowitz *et al.* 2005), ce qui pourrait expliquer la répartition différentielle des biotypes B et Ms sur des habitats cultivées soumis à des traitements insecticide fréquent (Sery 2007). Toutefois, des tests de sensibilité aux insecticides pour le biotype Ms n'ont jamais été réalisés. L'effet des insecticides (et de la résistance à ces derniers) sur la répartition des populations de *B. tabaci* à La Réunion, reste donc à être abordé.

Dans cette étude, on observe une distribution différentielle des fréquences d'hybrides selon les habitats type cultivé (B majoritaire) et type adventice. Dans l'habitat adventice, où la fréquence relative des biotypes est au profit des Ms, on observe plus d'hybrides que dans l'habitat cultivé où la fréquence relative est au profit des B. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les accouplements se font plus facilement lorsque les individus B se retrouvent face à beaucoup d'individus Ms et moins facilement lorsque les individus Ms se retrouvent face à beaucoup d'individus B. Un phénomène semblable a été expliqué par De Barro & Hart (2000), montrant que contrairement aux femelles d'un biotype indigène, les femelles B augmentent leur nombre d'accouplements face à de nombreux mâles du même biotype ou d'un biotype différent.

Evolution des fréquences d'infection

Les échantillonnages de la période S4 (Chapitre II), analysés pour leur symbiotype, nous ont précédemment permis de conclure que les hybrides F1 observés étaient préférentiellement issus de croisements femelle Ms x mâle B. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que les mères Ms bi-infectées par *Cardinium*/*Arsenophonus* ne permettaient pas d'obtenir la descendance d'hybrides attendue. L'une des hypothèses émises consistait en une moins bonne viabilité des hybrides porteurs de *Cardinium*/*Arsenophonus*. Enfin, nous avons décrit des interactions négatives entre l'endosymbiote *Arsenophonus* du biotype Ms et certains allèles nucléaires du biotype B, qui pourraient diminuer la viabilité des hybrides affectés par ces interactions. Les résultats obtenus en 2010 (S5), à savoir une augmentation de la fréquence des Ms (population parentale pure) porteurs de *Cardinium*/*Arsenophonus*, sont compatibles avec le lien précédemment proposé entre *Arsenophonus* et la diminution du nombre d'hybrides.

Nous avons pu, en outre, remarquer, entre 2006 et 2010, que les prévalences d'*Arsenophonus* et de *Cardinium* (uniquement présent dans la population Ms) et d'*Hamiltonella* dans la population B sont très fortes (>80%) et augmente au cours du temps. *Rickettsia* atteint une prévalence très forte pour les deux années d'échantillonnage (>90%) chez le biotype B. Ces fortes prévalences observées dans chaque biotype pourraient impliquer un taux de transmission maternelle maximum et présuseraient d'un avantage pour leur hôte ou bien d'une manipulation de la reproduction. En effet ces deux types de stratégies pourraient permettre aux symbiotes d'envahir la population d'hôte (pour revue (Engelstadter & Hurst 2009; Oliver *et al.* 2010)). Cependant pour expliquer ces fortes prévalences dans nos populations, le suivi des fréquences d'infections dans le temps est primordial ainsi que d'étudier le rôle précis de ces bactéries dans la biologie des populations de *B. tabaci*.

En conclusion, l'isolement reproducteur observé entre les biotypes B invasif et Ms indigène, qui permet la coexistence de ces deux biotypes sur l'île depuis la fin des années 90, pourraient ainsi être liés partiellement à la présence de barrières prézygotiques révélées par la préférence écologique d'habitat chez B et Ms. De plus la préférence écologique et la coexistence du biotype B et du biotype Ms sont probablement possibles grâce à l'hétérogénéité du milieu.

En effet, l'hétérogénéité spatiale réduit le risque d'extinction des populations indigènes par la présence de potentielles opportunités d'habitat (Melbourne *et al.* 2007). En effet, la présence de l'habitat adventice pourrait permettre au biotype Ms de se réfugier face à la pression du biotype B.

Les causes de cette préférence d'habitat pourraient être multiples, non seulement due à un évitement compétitif par interférence d'accouplement, mais aussi lié à de meilleures performances biologiques de chacun sur un type de plante hôte ou encore liée à des résistances différentielles entre les biotypes à certaines molécules d'insecticides.

Discussion générale

Les invasions biologiques en milieu insulaire offrent l'opportunité d'étudier de manière expérimentale les interactions entre les populations invasives et indigènes. À travers le modèle de l'insecte phytophage *B. tabaci* à l'Île de La Réunion, ce travail de thèse a permis de montrer l'importance de l'isolement reproducteur prézygotique dû à la ségrégation de l'habitat entre les biotypes de *B. tabaci* ainsi que la contribution de certains symbiotes dans la limitation aux flux de gènes entre les biotypes.

Dynamique et devenir d'une invasion biologique

Stades d'invasions

Dans une démarche d'épidémiologie-surveillance et de suivi des populations de *Bemisia tabaci* à La Réunion, ce travail de thèse a permis de décrire la première introduction du biotype Q à La Réunion en février 2010. Les données de séquençage du gène *COI* ainsi que les données de diversité de la communauté endosymbiotique montrent que les groupes génétiques Q1 et Q2 qui ont été introduits à La Réunion. Depuis le suivi des populations de *B. tabaci* après l'introduction du biotype B à la fin des années 90 (Delatte *et al.* 2006)), le biotype Q n'avait jamais été détecté. Cette nouvelle introduction est probablement très récente, puisque ces populations n'ont été détectées que sur un site à La Réunion (Saint Pierre) et presque exclusivement sur plante cultivée, l'habitat de type adventice de ce même site étant colonisé par le biotype Ms.

Dans le cadre du suivi de la population de biotype B introduit à la fin des années 90 et qui s'est rapidement propagé sur toute l'île dès 2001 (Delatte *et al.* 2006), nous avons pu montrer que le biotype B s'était durablement installé.

A La Réunion, les populations des biotypes Q et B se situeraient donc à des stades différents de leur processus d'invasion. En effet d'après la figure 1 (Lockwood *et al.* 2007), le biotype Q se trouverait en phase d'établissement dans le milieu et le biotype B se trouverait déjà en phase d'impact sur le milieu.

Caractéristiques écologiques et interactions entre les populations

De manière générale, les caractéristiques écologiques d'une population allochtone ainsi que ses interactions avec les populations autochtones et le milieu sont des facteurs clés qui déterminent le succès d'une invasion et le niveau de son impact sur le milieu (Lockwood *et al.* 2007). Dans le cas de *B. tabaci* l'impact sur le milieu est bien sûr déjà d'ordre économique, vu les dégâts occasionnés aux cultures maraîchères dans le monde (Berlinger 1986; Fauquet *et al.* 2008) mais son impact est également lié aux interactions écologiques avec le(s) biotype(s) résident(s).

Le premier facteur déterminant le succès de l'invasion constitue les caractéristiques biologiques de la population introduite. Celles-ci peuvent être étudiées à travers les traits d'histoire de vie, relatifs par exemple à l'exploitation de la ressource, à la valeur sélective, à l'adaptation à des gammes de températures plus ou moins larges, ou encore à la résistance aux insecticides. Ces caractéristiques montrent de grandes variations entre les biotypes. A La Réunion, le biotype B est plus performant que le biotype Ms en termes de croissance démographique sur une plus large gamme de températures et en termes de compétition sur la tomate (Delatte *et al.* 2009b). Le biotype B est aussi connu pour sa capacité à développer des résistances aux insecticides (Horowitz *et al.* 2003; Horowitz *et al.* 2005; Ma *et al.* 2010). Les caractéristiques biologiques du biotype Q introduit à La Réunion, n'ont pas encore été étudiées mais ce biotype est surtout redouté dans le monde pour sa capacité de résistance à de nombreux insecticides (Horowitz *et al.* 2005), ainsi que pour son avantage écologique sur certaines plantes hôtes (Muniz 2000; Muniz & Nombela 2001).

Le deuxième facteur déterminant le succès de l'invasion est associé aux interactions directes entre la population invasive avec la population indigène. Plus précisément la compétition par interférence d'accouplement chez les espèces proches ainsi que les phénomènes de compétition liés à une meilleure exploitation de la ressource constituent une partie des nombreux facteurs pouvant contribuer au déplacement d'une espèce par une autre (Reitz & Trumble 2002). Dans le cas des populations de *B. tabaci* à La Réunion, avec l'arrivée récente du biotype Q, nous nous attendons à observer des interactions complexes entre ces trois biotypes exploitant les mêmes habitats.

Les interactions entre le biotype invasif B et le biotype indigène Ms ont été étudiées à travers le déplacement du biotype Ms sur une niche plus restreinte (voir 2^{ème} partie de cette discussion). Cependant les interactions entre le biotype Q nouvellement établi et les deux autres biotypes B et Ms sont encore inconnues.

Chez *B. tabaci* et dans le monde, le remplacement de populations autochtones par l'introduction de populations invasives du biotype Q ou du biotype B a été montré dans de nombreux pays (pour revue : (De Barro *et al.* 2010)). Ainsi, la compétition par interférence d'accouplement favorisant l'établissement de ces biotypes a été démontrée et constitue l'un des facteurs principaux dans le déplacement des populations autochtones selon ces auteurs. Ce type de compétition a été étudié en détail entre les biotypes B et AN en Australie ainsi qu'entre les biotypes B et ZHJ1 en Chine (Liu *et al.* 2007). Dans ces deux cas, le biotype B déplace et exclut complètement les biotypes indigènes sans phase d'hybridation. L'expansion du biotype Q (groupe Q1) en Chine a beaucoup été étudiée et montre le déplacement total du biotype B par le biotype Q (Chu *et al.* 2010). Cependant des études sur les biotypes B et Q (groupe Q2) montrent qu'en Israël, ces biotypes coexistent mais ne s'hybrident pas (Horowitz *et al.* 2003; Khasdan *et al.* 2005).

A La Réunion, les interactions qui se mettent en place n'ont été que très peu documentées et seulement dans le cas de populations de laboratoire (Baudin 2008). Ces études préliminaires semblent suggérer que le biotype B pourrait remplacer le biotype Ms dans des conditions de laboratoire au bout de trois générations, lorsqu'au départ il avait été introduit la même proportion d'individus de biotype B et de biotype Ms. Cette même étude semble également montrer des différences de comportement sexuel entre les deux biotypes étudiés. La femelle de biotype B accepterait plus d'accouplements que la femelle de biotype Ms. Elles augmenteraient leur fréquence d'accouplement en présence de mâles B. Le mâle Ms mettrait plus de temps à s'accoupler (environ 12 heures) avec une femelle que le mâle B qui pourrait être sexuellement actif seulement 4 heures après émergence. Cette étude semble également suggérer que la durée des étapes du comportement d'accouplement ne varie pas entre les 2 biotypes.

A La Réunion, nous avons montré dans le chapitre IV, la présence des deux groupes Q1 et Q2, proches génétiquement et en proportion majoritaire pour le groupe Q1. D'après ces résultats, on pourrait s'attendre au déplacement du biotype B par le biotype Q (groupe Q1).

Cependant, cette prédiction dépend de la dynamique d'invasion de ces deux groupes Q1 et Q2 en termes d'adaptation au milieu et d'interaction avec les biotypes résidents.

Les bactéries endosymbiotiques présentes chez *B. tabaci* pourraient avoir un lien avec ces facteurs déterminants le succès de l'invasion des biotypes B et Q. Néanmoins, des études suggèrent que la présence de la bactérie endosymbiotique *Rickettsia* chez le biotype B et le biotype Q (groupe Q2) provoquerait une plus grande sensibilité à certains insecticides (Kontsedalov *et al.* 2008; Ghanim& Kontsedalov 2009). De plus, de nombreux traits de vie ont été mesurés pour étudier l'effet de cette bactérie sur la fitness globale du biotype B et aucun lien n'a été trouvé (Chiel *et al.* 2009a). Cependant, la bactérie endosymbiotique *Hamiltonella* semblerait être en lien avec la facilitation de la transmission du virus du TYLCV chez le biotype B (Gottlieb *et al.* 2010) par le biais d'une protéine GroEL produite par cette bactérie.

Les bactéries endosymbiotiques présentes chez *B. tabaci* pourraient avoir un lien avec ces facteurs déterminants le succès de l'invasion des biotypes B et Q. Nous avons vu dans le chapitre II et cela sera précisé dans la deuxième partie de cette discussion, que la bactérie *Arsenophonus* et certains allèles nucléaires du biotype B sont en interactions négatives dans les populations hybrides et pourraient mener à la non viabilité des hybrides présentant cette association délétère. A La Réunion, le biotype Q (groupe Q2) héberge *Arsenophonus* et dans le cas d'une potentielle hybridation avec le biotype B, il serait intéressant de savoir si ces interactions se renouvellent.

Il semble donc primordial à La Réunion de préciser les caractéristiques écologiques et les interactions des deux populations du biotype Q (compétition, hybridation) avec les autres biotypes et de suivre leurs dynamiques d'invasion afin de mieux appréhender l'impact de ces populations sur le milieu insulaire réunionnais.

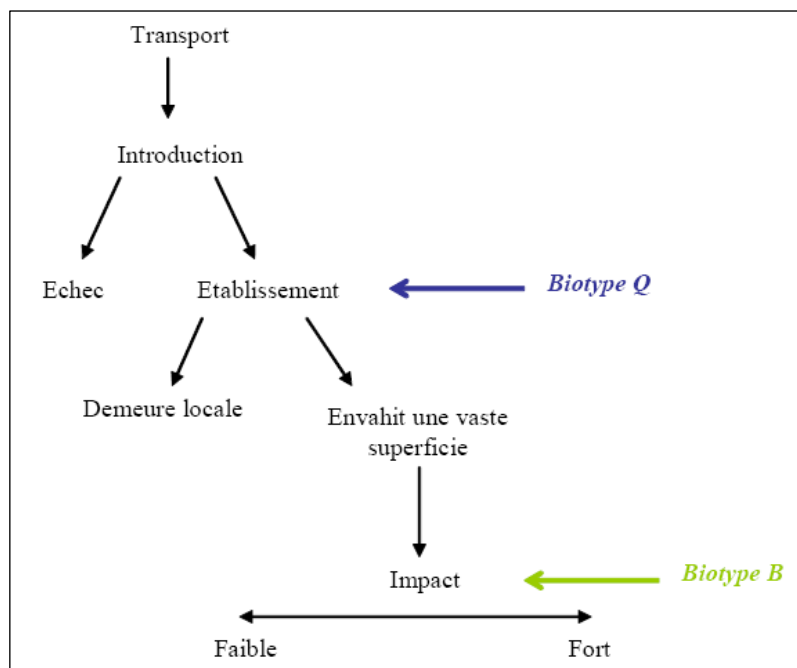


Figure 1. Les différentes étapes d'un processus d'invasion d'après Lockwood *et al.* (Lockwood *et al.* 2007) et situation des biotypes Q et B à La Réunion dans ce processus.

Isolement prézygotique : la ségrégation d'habitat

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à comprendre le rôle de l'habitat dans la structure des populations de *B. tabaci* à La Réunion (Chapitre IV). L'étude de la répartition des deux biotypes B (invasif) et Ms (indigène) sur les types d'habitat cultivé et adventice au cours de neuf années d'échantillonnage montre une différenciation de niche au cours du temps. En 2001, presque au début de l'introduction du biotype B à La Réunion (introduit à la fin des années 90), l'habitat adventice étaient aussi bien colonisé par le biotype B que par le biotype Ms. Au fil du temps, le biotype Ms s'installe préférentiellement sur type adventice et le biotype B, déjà préférentiellement sur type cultivée lorsqu'il est au contact du biotype Ms, conserve cet habitat. On assiste ainsi petit à petit à une ségrégation de l'habitat de ces populations qui, initialement en sympatrie, se trouvent finalement séparées dans l'espace. Ces résultats sont d'autant plus marquants, que lorsque le biotype B ou le biotype Ms se trouve seul dans un site, ils colonisent les deux types d'habitats (voir Chapitre IV). Même si le biotype Ms a été trouvé très régulièrement sur type cultivé dans certaines îles de l'Océan Indien non colonisées par le biotype B (Delatte *et al.* *In Press*).

L'étude de notre équipe ne portait alors pas sur ce sujet, donc très peu de données existent sur le biotype Ms lorsqu'il est le seul biotype en place.

Avant l'introduction du biotype B, ces deux biotypes ont évolué en allopatrie et se sont donc de plus en plus différenciés et isolés d'un point de vue génétique et probablement d'un point de vue écologique et comportemental. Cependant cet isolement ne s'est pas révélé complet puisque lors de leur rencontre au cours de l'introduction du biotype B, ces biotypes ont pu s'hybrider en milieu naturel et produire une descendance fertile ((Delatte *et al.* 2006) et Chapitre II). Dans ce cas, la spécialisation d'habitat pourrait favoriser l'achèvement de l'isolement reproducteur entre ces deux biotypes. La divergence dans la préférence d'habitat peut en effet être une cause partielle d'isolement reproducteur entre des populations d'insectes phytophages qui se reproduisent sur la plante sur laquelle ils se nourrissent (Feder *et al.* 1994).

A La Réunion, les populations de *B. tabaci* biotypes B et Ms se retrouvent probablement au début de leur isolement reproducteur complet suite à un second contact (Figure 2).

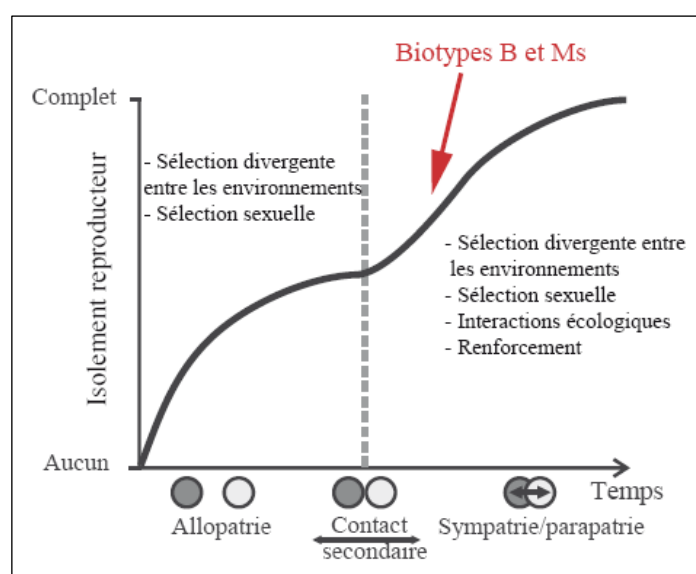


Figure 2. Scénario général de la mise en place de l'isolement reproducteur. L'isolement reproducteur entre deux populations est absent au début du processus de spéciation (sur la gauche) et évolue jusqu'à s'achever (sur la droite). Les populations sont initialement en allopatrie, mais un second contact peut avoir lieu (ligne verticale en pointillés). A partir de ce moment, une deuxième étape du processus de spéciation se met en place. Les causes écologiques de la divergence par lesquelles l'isolement reproducteur se met en place sont listés de part à d'autre de l'étape de second contact (schéma inspiré de Rundle *et al.* (Rundle & Nosil 2005)). La flèche rouge représente la position supposée dans le temps de l'isolement reproducteur entre B et Ms.

Il est important de rappeler que l'existence de « races spécialisées aux plantes hôtes » (« *host race* ») a été le premier critère proposé pour définir les biotypes de *B. tabaci* suite aux observations de différences dans la spécificité d'hôte de certaines populations de *B. tabaci*. Aux Etats-Unis, les biotypes *Jatropha* & *Sida* (Brown *et al.* 1995b) sont spécialisés sur les plantes qui ont donné leur nom à ces biotypes. En Côte d'Ivoire Burban *et al.* (1992) ont décrit une population distincte de *B. tabaci* spécialisée sur le manioc et sur l'aubergine sauvage et une seconde population nommée « Okra » (ou Gombo), plus polyphage mais qui ne colonise pas le manioc. En Uganda, Legg (1995) ont également décrit deux populations spécialisées sur plante hôte, l'une sur du manioc et l'autre sur le coton ou la patate douce. Plus récemment, Maruthi *et al.* (2004) ont montré que des populations d'Afrique, d'Inde et d'Uganda spécialisées sur des type de plante hôte, étaient reproductivement isolées. D'après Berlocher&Feder (2002), le terme de « *host race* » représente hypothétiquement l'état naissant d'une nouvelle espèce associée à une plante hôte. Cette association représenterait l'état final de la spéciation.

Il serait intéressant d'étudier le type d'habitat et la répartition des populations de biotype Ms dans les zones où elles sont présentes sans le biotype B (un seul exemple en 2010 sur le site de Petite Ile). A Madagascar, aux Seychelles, ou aux Comores, par exemple, le biotype B n'a pas, a priori, encore été introduit ou ne s'est pas installé durablement. En effet, le déplacement de niche du Ms sur plante adventice à La Réunion serait d'autant concluant si les populations de Ms étaient également réparties sur d'autres plantes que les plantes adventices dans les zones géographiques où il est le seul biotype.

Des études de traits de vie sur plantes cultivées ont déjà été réalisée pour les biotypes B et Ms (Delatte *et al.* 2009b) et Q (Bonato *et al.* 2007). Les mêmes études sur plantes adventices pourraient permettre de comprendre si le biotype Ms serait plus performant sur ces plantes, ce qui expliquerait également que le biotype Ms n'est pas complètement déplacé par le biotype invasif B. Evidemment, avec l'arrivée du biotype Q à La Réunion, l'élevage en laboratoire de lignées issues de ce biotype permettront d'effectuer toutes ces expérimentations afin de mieux appréhender le devenir des populations de B et Ms face à cette nouvelle introduction.

La diminution des hybrides entre les biotypes B et Ms au cours du temps a pu être mis en lien avec un type d'isolement reproducteur prézygotique causé par la ségrégation de la niche entre ces deux biotypes. La mise en place de barrières postzygotiques peut également en partie expliquer un isolement reproducteur et une diminution des hybrides. En étudiant la diversité du cortège des bactéries endosymbiotiques dans les populations des biotypes de *B. tabaci* à La Réunion, cette thèse a apporté des éléments de réponse à cette question.

Diversité de la communauté endosymbiotique et hybridation non aléatoire entre les biotypes : isolement reproducteur postzygotique

L'étude de la diversité de la communauté endosymbiotique des biotypes Q, B, Ms et des hybrides (entre les biotypes B et Ms) à La Réunion a révélé une très grande diversité de ces bactéries. Outre le symbiote primaire obligatoire *Portiera aleyrodidarum* présent dans toutes ces populations, nous avons pu détecter cinq endosymbiotes secondaires sur six déjà décrits chez *B. tabaci* (Zchori-Fein & Brown 2002) : *Cardinium* (Bacteroidetes, Sphingobacteria), *Wolbachia* (Proteobacteria, Alphaproteobacteria), *Rickettsia* (Proteobacteria, Alphaproteobacteria), *Arsenophonus* (Proteobacteria, Gammaproteobacteria) et *Hamiltonella* (Proteobacteria, Gammaproteobacteria). Cette diversité élevée de bactéries endosymbiotiques s'accompagne d'une grande variabilité d'assemblage entre les différents biotypes présents à La Réunion. Le biotype Q, nouvellement introduit à La Réunion (en 2010), est composé de deux populations différenciées génétiquement, les groupes Q1 et Q2. Le groupe Q1 héberge *Hamiltonella* et *Cardinium* majoritairement en co-infection et le groupe Q2 héberge *Rickettsia*, *Wolbachia* en bi-infection ainsi qu'*Arsenophonus* en tri-infection avec les deux autres bactéries (voir Chapitre I). Le biotype B héberge *Hamiltonella* et *Rickettsia* en très forte prévalence (>75%) et presque toujours en co-infection. Le biotype Ms héberge *Cardinium*, *Arsenophonus* en forte prévalence (>65%) et majoritairement en co-infection, ainsi que *Rickettsia* en faible prévalence et toujours en co-infection avec *Cardinium* et *Arsenophonus* (voir Chapitres II et IV).

Les études précédentes effectuées dans les populations de biotype Q et B d'autres régions du monde ne montrent pas toujours des résultats similaires à ceux observés à La Réunion.

Les populations de biotype Q étudiées par Chiel *et al.* (2007) provenant d'Israël et appartenant probablement au groupe génétique Q2 hébergent *Rickettsia*, et *Arsenophonus* et *Wolbachia*. Tous les assemblages possibles entre ces trois bactéries ont été détectés. Les populations de biotype Q étudiées par Gueguen *et al.* (2010) ont porté sur trois groupes différenciés génétiquement par le gène *COI* : Q1 (Maroc, Tunisie, Burkina Faso, Cameroun, Soudan, France), Q2 (Israël), Q3 (Burkina Faso) et associés à des combinaisons endosymbiotiques différentes. Grâce à l'analyse phylogénétique des différentes bactéries détectées, les auteurs ont également révélé la présence de plusieurs souches pour un même symbiote : quatre souches différentes d'*Arsenophonus*, trois souches différentes de *Cardinium*, deux souches différentes de *Wolbachia* et une seule souche pour *Rickettsia* ainsi que pour *Hamiltonella*. Le groupe Q1 serait associé à *Hamiltonella*, *Cardinium* (souche C1) et *Wolbachia* (souche W1), le groupe Q2 serait associé à *Rickettsia*, *Wolbachia* (souche W2) et *Arsenophonus* (souche A1) et le groupe Q3 serait associé à *Rickettsia* et *Arsenophonus* (souche A2).

Les populations du biotype Q étudiées en Croatie (Skaljac *et al.* 2010) révèlent la présence d'*Hamiltonella*, de *Cardinium*, de *Wolbachia* et de *Rickettsia* mais jamais celle d'*Arsenophonus* comme dans les populations de biotype Q étudiées par Gueguen *et al.* (Gueguen *et al.* 2010). Les multiples infections avec ces quatre bactéries sont très fréquentes et les prévalences sont très variables suivant les populations étudiées (Skaljac *et al.* 2010).

Toutes les populations de *B. tabaci* du biotype B étudiées (Israel, Croatie, Antilles, Tunisie, La Réunion) hébergent *Hamiltonella* et *Rickettsia*, en forte prévalence, en majorité en co-infection et beaucoup plus rarement en infection simple ((Chiel *et al.* 2007; Gueguen *et al.* 2010; Skaljac *et al.* 2010) et Chapitres II et IV).

Quant au biotype Ms, quelques individus de laboratoire ont été précédemment étudiés (Gueguen *et al.* 2010) et révèlent la présence de *Cardinium* (souche 2) et de *Rickettsia* mais pas celle d'*Arsenophonus* comme nos populations sauvages de La Réunion. A ce jour, ces quatre études ((Chiel *et al.* 2007; Gueguen *et al.* 2010; Skaljac *et al.* 2010), Chapitres I et II) sont les seules à avoir pris en compte la totalité de la communauté endosymbiotique connue chez le complexe d'espèces *B. tabaci*.

Toutes ces études de diversité des bactéries ont montré une forte association entre les biotypes et la communauté endosymbiotique associée.

La diversité des infections entre les biotypes et au sein d'un même biotype (les infections multiples) ainsi que la variabilité dans les taux d'infection montre la complexité de l'histoire évolutive de ces infections qui pourrait être le résultat de nombreux mécanismes tels que des transferts horizontaux, des pertes ou des acquisitions de ces bactéries au cours de l'évolution (montrés chez d'autres groupes d'insectes et pour revue : (Oliver *et al.* 2010)). Cette diversité pose également la question du coût et des bénéfices potentiels aux co-infections, résultant d'interactions négatives ou positives entre les bactéries au sein d'un même individu (Oliver *et al.* 2006) et également de leur rôle potentiel dans l'évolution de leur hôte.

Ce travail de thèse a justement permis de montrer l'implication d'une de ces bactéries symbiotique dans la contribution à la mise en place de barrières postzygotiques entre les biotypes B et Ms.

Le cortège symbiotique de la population d'hybrides entre les populations B et Ms a été analysée et nous avons pu montrer que ces hybrides hébergeaient les mêmes bactéries que leurs parents mais qu'il existait une forte différenciation génétique au sein de hybrides selon leur combinaison symbiotique, suggérant des hybridations non aléatoires. Des analyses plus précises ont révélées l'existence d'un déséquilibre cytonucléaire, et plus particulièrement d'une interaction négative entre la bactérie *Arsenophonus*, présente chez certaines populations du biotype Ms et les hybrides, et certains allèles nucléaire présents chez le biotype B. Le faible taux d'infection par *Cardinium* et *Arsenophonus* (comparé aux parents Ms) des populations hybrides de première génération (B x Ms), pourrait alors être expliquée par une perte d'*Arsenophonus* au sein des hybrides ou par une faible valeur sélective des hybrides présentant cette association « *Arsenophonus*- allèles nucléaire du biotype B » (voir Chapitre II).

La contribution de cette incompatibilité génétique dans la mise en place de barrières postzygotiques est révélée pour la première fois dans le complexe d'espèces de *B. tabaci* et pourrait donc en partie expliquer le maintien de la différenciation génétique et l'isolement reproducteur entre les biotypes B et Ms et la diminution du nombre d'hybrides dans la nature à La Réunion.

La distribution des bactéries endosymbiotiques présentes au sein du complexe d'espèce *B. tabaci*, l'association non aléatoire de certaines bactéries avec les biotypes de *B. tabaci* ainsi que les interactions génétiques révélées dans les populations de La Réunion, montrent que

l'étude de la globalité de la communauté endosymbiotique se révèle, dans un premier temps, primordiale afin de comprendre la structure génétique de ce complexe (Stahlhut 2010; Gueguen *et al.* 2010).

Les interactions de ces bactéries avec leur hôte ont été décrites chez de nombreux groupes d'insectes allant du mutualisme au parasitisme de la reproduction (Introduction générale, pour revue : (Moran *et al.* 2008)). Le rôle de ces bactéries dans la biologie de *B. tabaci* est encore largement inconnu. Mais avant d'étudier le rôle de ces bactéries dans les populations de *B. tabaci*, il est important d'étudier leur diversité génétique. Ainsi, grâce à l'étude phylogénétique de chacune des bactéries présentes dans nos populations, nous avons pu détecter une grande diversité nucléotidique au sein des bactéries *Arsenophonus* et *Cardinium*. Notamment quatre souches différentes d'*Arsenophonus*, deux souches différentes de *Cardinium* ont pu être mises en évidence. Toutefois aucune diversité n'a été mise en évidence dans nos échantillonnages pour les trois autres genres bactériens présents dans les populations de La Réunion (*Rickettsia*, *Wolbachia* et *Hamiltonella*). Ces différentes souches ont en partie été (les gènes étudiés sont parfois différents) décrites précédemment dans les biotypes de *B. tabaci* (Carletto *et al.* 2008; Ahmed *et al.* 2009; Gueguen *et al.* 2009; Duron *et al.* 2010; Gueguen *et al.* 2010).

Cette diversité de souches au sein d'un même biotype, entre les biotypes et partagée avec d'autres groupes d'arthropodes suppose que les phénomènes de transferts horizontaux, de pertes et d'acquisition de symbiotes sont très probables. Les transferts horizontaux pourraient se faire via les plantes, les parasitoïdes ou par accouplements ((Vavre *et al.* 1999; Moran & Dunbar 2006; Chiel *et al.* 2009b; Oliver *et al.* 2010).

Une partie de ce travail de thèse révèle que la diversité d'*Arsenophonus* détectée dans nos populations mérite une attention particulière. D'une part, la description de trois souches au sein de la population des hybrides (voir Chapitre III) ainsi que la présence d'une seule souche détectée au sein du biotype Ms pourrait supposer de l'infection d'un même individu par plusieurs souches d'*Arsenophonus*. Ainsi une souche quantitativement majoritaire pourrait être présente dans les populations « pures » de biotype Ms (par conséquent séquences majoritaire détectée lors des séquençages par PCR directes). Nous avons vu précédemment dans cette partie de la discussion, que l'hypothèse d'une perte d'*Arsenophonus* chez les hybrides était probable, due à des interactions négatives avec certains allèles nucléaires du biotype B.

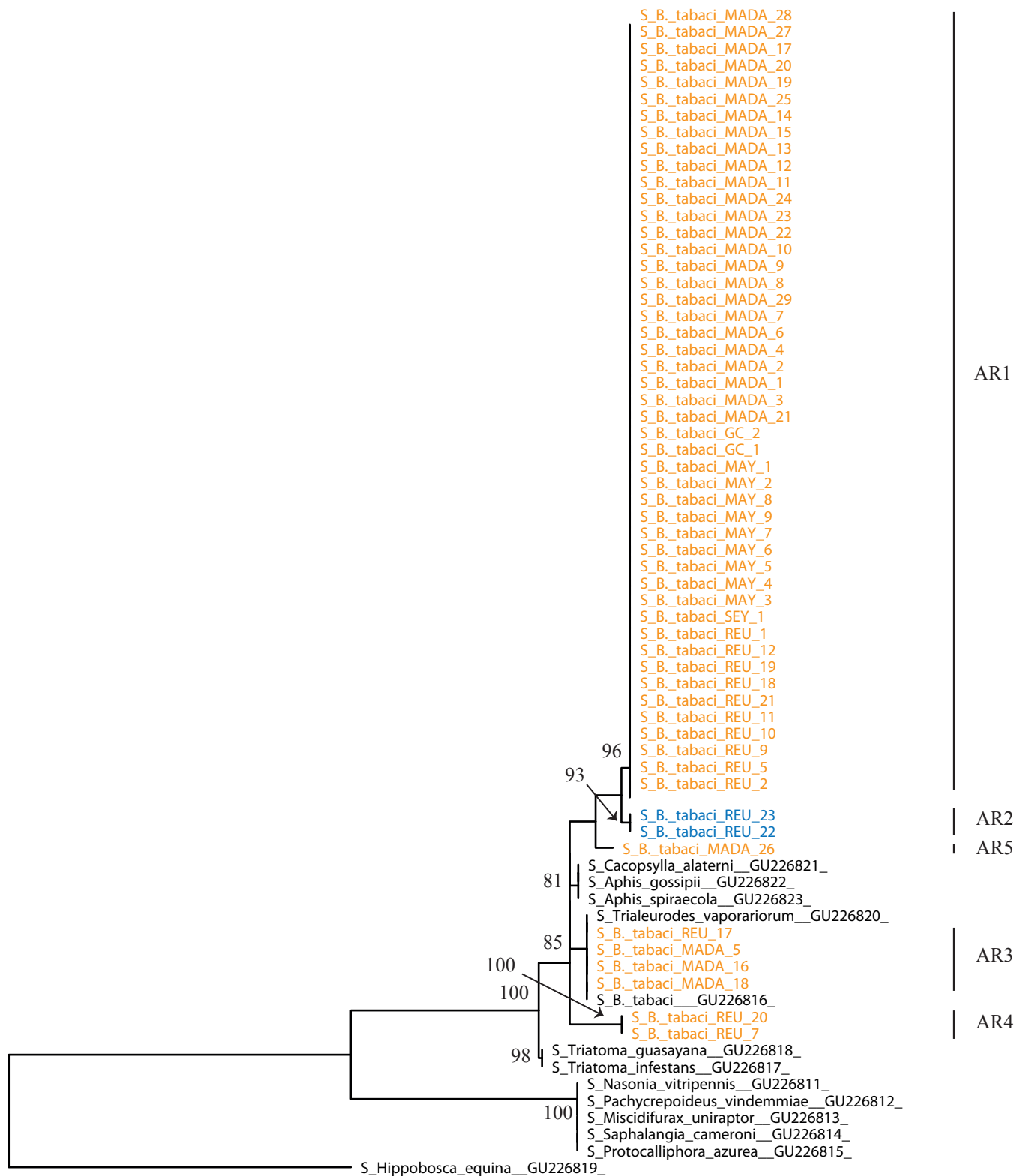


Figure 3. Phylogénie du gène *fbaA* d'*Arsenophonus* construite par la méthode de Maximum de Vraisemblance (« Maximum Likelihood ») implémentée dans le logiciel PhyML. Le modèle d'évolution GTR+G à été retenu par le logiciel ModelTest pour la construction de cet arbre. Les symbiotes ont le préfixe S, suivi du nom de l'hôte. Les séquences établies pour cette étude proviennent de Madagacar (MADA), de Grande Comore (GC), des Seychelles (SEY) et de La Réunion (REU). Les séquences de biotype Ms sont en orange et celles du biotype Q (groupe Q2) en bleu. Les séquences disponibles dans la banque de données GenBank sont en noir, suivies du numéro d'accèsion entre parenthèses. Les lettres AR1 à AR5 indiquent les clades des différentes souches détectées. Les nombres indiqués sur les branches représentent les valeurs de pourcentage de bootstrap calculées à partir de 100 répliques. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 70% sont indiquées.

Une seconde hypothèse serait alors d'expliquer que lors d'un accouplement entre une femelle Ms hébergeant deux souches d'*Arsenophonus* (une quantitativement majoritaire et une minoritaire) avec un mâle de biotype B, l'hybride issu de cet accouplement pourrait perdre la souche majoritaire présente chez sa mère et n'héberger qu'une souche, la minoritaire, par conséquent identifiée comme différente dans la reconstruction phylogénétique de cette bactérie.

Ces hypothèses ainsi que la diversité d'*Arsenophonus* dans plusieurs biotypes de *B. tabaci* étudiés dans le monde révèlent que la diversité d'*Arsenophonus* mérite d'être plus précisément étudiée, c'est-à-dire sur un plus grand nombre d'individus, issus de biotypes et de zones géographiques différentes. Cette étude est en cours dans notre équipe et en collaboration avec l'équipe de Laurence Mouton (UMR CNRS 5558) afin d'étudier la phylogénie d'*Arsenophonus* sur trois gènes différents (dont *fbaA* utilisé dans le Chapitre III). La figure 3 présente les premiers résultats obtenus sur la reconstruction phylogénétique d'*Arsenophonus* à partir du gène *fbaA* sur des échantillons de *B. tabaci* de biotype Ms de l'Océan Indien (Madagascar, Seychelles, Comores, Maurice et Réunion). Ces résultats préliminaires montrent que la majorité des séquences obtenues appartiennent au clade AR1 précédemment décrit dans le chapitre III et regroupe des individus provenant de toutes les localisations collectées. On retrouve également trois séquences provenant d'individus de Madagascar dans le clade AR3. Une nouvelle souche est détectée provenant d'un individu de Madagascar et qui se retrouve à la base des clades AR1 et AR2. Ces résultats préliminaires révèlent d'une part la grande diversité d'*Arsenophonus* dans la zone sud-ouest de l'océan indien et d'autre part, renforcent les résultats précédemment obtenus à La Réunion quant à la forte diversité de cette bactérie au sein même du biotype Ms.

De manière globale, des expérimentations de croisements entre lignées iso-femelles infectées par ces bactéries sont indispensables et permettraient *i)* par le biais d'études sur les traits d'histoire de vie, de mieux comprendre le rôle de ces bactéries symbiotiques dans les populations de *B. tabaci* à La Réunion, *ii)* de tester les interactions possibles entre ces bactéries, *iii)* de tester la possibilité de transfert horizontaux via la plante ou via des parasitoïdes infectés par ces mêmes bactéries.

Références

- Adkins S, Webb SE, Achor D, Roberts PD, Baker CA (2007) Identification and characterization of a novel whitefly-transmitted member of the family Potyviridae isolated from cucurbits in Florida. *Phytopathology* **97**, 145.
- Ahmed MZ, Ren SX, Xue X, Li XX, Jin GH, Qiu BL (2010) Prevalence of Endosymbionts in *Bemisia tabaci* Populations and Their In Vivo Sensitivity to Antibiotics. *Current Microbiology*.
- Ahmed MZ, Shatters RG, Ren SX, Jin GH, Mandour NS, Qiu BL (2009) Genetic distinctions among the Mediterranean and Chinese populations of *Bemisia tabaci* Q biotype and their endosymbiont Wolbachia populations. *Journal of Applied Entomology* **133**, 733-741.
- Alexander RD (1967) Seasonal and Daily Chirping Cycles in the Northern Spring and Fall Field Crickets, *Gryllus Veletis* and *G. Pennsylvanicus*. *The Ohio Journal of Science* **67**, 200-209.
- Andreadis TG (1985) Life cycle, epizootiology, and horizontal transmission of Amblyospora (Microspora: Amblyosporidae) in a univoltine mosquito, *Aedes stimulans*. *Journal of Invertebrate Pathology* **46**, 31-46.
- Arnold J (1993) Cytonuclear Disequilibria in Hybrid Zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**, 521-553.
- Asmussen MA, Basten CJ (1996) Constraints and normalized measures for cytonuclear disequilibria. *Heredity* **76** (Pt 3), 207-214.
- Barbault R, Atramentowicz M (2010) *Les invasions biologiques, une question de natures et de sociétés* Quae.
- Barton NH (2001) Speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 325.
- Barton NH, Hewitt GM (1989) Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* **341**, 497-503.
- Basten CJ, Asmussen MA (1997) The exact test for cytonuclear disequilibria. *Genetics* **146**, 1165-1171.
- Baudin R (2008) *Etude de la compétition par interférence des biotypes B et Ms de Bemisia tabaci sur l'île de La Réunion*, Université de Pau et des pays de l'Adour.
- Baumann P (2005) Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology* **59**, 155-189.

- Bedford ID, Briddon RW, Brown JK, Rosell RC, Markham PG (1994) Geminivirus-Transmission and Biological Characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotypes from Different Geographic Regions. *Annals of Applied Biology* **125**, 311-325.
- Berlinger MJ (1986) Host plant resistance to *Bemisia tabaci*. *Agriculture Ecosystems Environmental* **17**, 62-82.
- Berlocher SH (1995) Population structure of *Rhagoletis mendax*, the blueberry maggot. *Heredity* **74**, 542-555.
- Berlocher SH, Feder JL (2002) Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy? *Annual Review of Entomology* **47**, 773-815.
- Bile A (2010) *Evolution de la diversité des biotypes de Bemisia tabaci et de leur cortège symbiotique sur l'Ile de La Réunion*, Université Paul Sabatier.
- Bird J, Maramorosch K (1978) Virus and virus diseases associated with whiteflies. *Advances in Virus Research* **22**, 55-110.
- Blackburn TM, Cassey P, Lockwood JL (2008) The island biogeography of exotic bird species. *Global Ecology and Biogeography* **17**, 246-251.
- Blondel J (1995) *Biogéographie. Approche écologique et évolutive* Masson, Paris.
- Blum M, Walters D, Burkhead N, Freeman B, Porter B (2010) Reproductive isolation and the expansion of an invasive hybrid swarm. *Biological Invasions* **12**, 2825-2836-2836.
- Bonato O, Lurette A, Vidal C, Fargues J (2007) Modelling temperature-dependent bionomics of *Bemisia tabaci* (Q-biotype). *Physiological Entomology* **32**, 50-55.
- Bordenstein SR (2003) Symbiosis and the origin of species. In: *Insect Symbiosis* (eds. Bourtzis K, Miller TA), pp. 283-304. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bordenstein SR, O'Hara FP, Werren JH (2001) Wolbachia-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature* **409**, 707-710.
- Bourriquet G (1938) Note concernant les maladies des plantes cultivées à La Réunion. *Revue Agricole Réunion* **43**, 33-38.
- Boykin LM, Shatters Jr. RG, Rosell RC, McKenzie CL, Bagnall RA, De Barro P, Frohlich DR (2007) Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**, 1306-1319.
- Breeuwer JA, Werren JH (1990) Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* **346**, 558-560.

- Broadbent AB, Footitt RG, Murphy GD (1989) Sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: aleyrodidae), a potential insect pest in Canada. *Canadian Entomologist*. **121**, 1027-1028.
- Brown J (2007) The *Bemisia tabaci* Complex: Genetic and Phenotypic Variability Drives Begomovirus Spread and Virus Diversification. Plant Disease APSNet Feature Article.
- Brown J, Bird J (1995) Variability within the *Bemisia tabaci* species complex and its relation to new epidemics caused by Geminiviruses. *CEIBA* **36**, 73-80.
- Brown JK (2000) Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-Begomovirus complexes. *Virus Research* **71**, 233-260.
- Brown JK, Caballero R, Rogan D, Bird J (2001) Evidence for a *Bemisia tabaci* species complex: mitochondria cytochrome oxidase I gene complex sequence analysis confirms one group comprising all *B. tabaci*, and mating between AZ A, AZ B, and *Jatropha* biotypes corroborate a single biological species. In: *European Whitefly Symposium* p. 23, Ragusa, Sicily, Italy.
- Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC (1995a) The Sweet-Potato or Silverleaf Whiteflies - Biotypes of *Bemisia-Tabaci* or a Species Complex. *Annual Review of Entomology* **40**, 511-534.
- Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC (1995b) The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review of Entomology* **40**, 511-534.
- Buchner P (1965) *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*, New York, 909pp.
- Burban C, Fishpool LDC, Fauquet C, Fargette D, Thouvenel JC (1992) Host-associated biotypes within West African populations of the whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.), (Homomoptera: Aleyrodidae). *Journal of Applied Entomology*. **113**, 416-423.
- Burke G, Fiehn O, Moran N (2009) Effects of facultative symbionts and heat stress on the metabolome of pea aphids. *Isme Journal* **4**, 242-252.
- Byrne DN, Bellows TJR (1991) Whitefly biology. *Annual Review of Entomology* **36**, 431-457.
- Byrne FJ, Cahill M, Denholm I, Devonshire AL (1995) Biochemical identification of interbreeding between B-type and non B-type strains of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci*. *Biochemical Genetics* **33**, 13-23.
- Calvert LA, Cuervo M, Arroyave JA, Constantino LM, Bellotti A, Frohlich D (2001) Morphological and mitochondrial DNA marker analyses of whiteflies (Homoptera :

- Aleyrodidae) colonizing cassava and beans in Colombia. *Annals of the Entomological Society of America* **94**, 512-519.
- Carletto J, Gueguen G, Fleury F, Vanlerberghe-Masutti F (2008) Screening the bacterial endosymbiotic community of sap-feeding insects by terminal-restriction fragment length polymorphism analysis. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **129**, 228-234.
- Carlsson J (2008) Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* **99**, 616-623.
- Chen D-Q, Montllor CB, Purcell AH (2000) Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **95**, 315-323-323.
- Chiel E, Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Mozes-Daube N, Katzir N, Inbar M, Ghanim M (2007) Biotype-dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci*. *Bulletin of Entomological Research* **97**, 407-413.
- Chiel E, Inbar M, Mozes-Daube N, White JA, Hunter MS, Zchori-Fein E (2009a) Assessments of Fitness Effects by the Facultative Symbiont *Rickettsia* in the Sweetpotato Whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America* **102**, 413-418.
- Chiel E, Zchori-Fein E, Inbar M, Gottlieb Y, Adachi-Hagimori T, Kelly SE, Asplen MK, Hunter MS (2009b) Almost there: transmission routes of bacterial symbionts between trophic levels. *PLoS ONE* **4**, e4767.
- Chu D, Wan FH, Tao YL, Liu GX, Fan ZX, Bi YP (2008) Genetic differentiation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype Q based on mitochondrial DNA markers. *Insect Science* **15**, 115-123.
- Chu D, Wan FH, Zhang YJ, Brown JK (2010) Change in the biotype composition of *Bemisia tabaci* in Shandong Province of China from 2005 to 2008. *Environmental Entomology* **39**, 1028-1036.
- Chu D, Zhang YJ, Brown JK, Cong B, Xu BY, Wu QJ, Zhu GR (2006) The introduction of the exotic Q biotype of *Bemisia tabaci* from the Mediterranean region into China on ornamental crops. *Florida Entomologist* **89**, 168-174.
- Claridge MF, Dawah HA, Wilson MR (1997) Species in insect herbivores and parasitoids-sibling species, host races and biotypes. In: *Species, The Units of Biodiversity* (ed. Claridge M.F. DHA, Wilson M.R.), pp. 247-272. Chapman & Hall, London.

- Clerget-Froidevaux MS, Seugnet I, Demeneix BA (2004) Thyroid status co-regulates thyroid hormone receptor and co-modulator genes specifically in the hypothalamus. *FEBS Letters* **569**, 341-345.
- Comas I, Moya A, Gonzalez-Candelas F (2007) From phylogenetics to phylogenomics: the evolutionary relationships of insect endosymbiotic gamma-Proteobacteria as a test case. *Systematic Biology* **56**, 1-16.
- Cooley JR, Simon C, Marshall DC (2003) Temporal Separation and Speciation in Periodical Cicadas. *Bioscience* **53**, 151-157.
- Costa HS, Westcot DM, Ullman DE, Johnson MW (1993) Ultrastructure of the endosymbionts of the whitefly; *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*. *Protoplasma* **176**, 106-115.
- Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation* Sinauer Associates, Sunderland, MA, 545pp.
- Cruzan MB, Arnold ML (1999) Consequences of cytonuclear epistasis and assortative mating for the genetic structure of hybrid populations. *Heredity* **82**, 36-45.
- Dalmon A, Halkett F, Granier M, Delatte H, Peterschmitt M (2008) Genetic structure of the invasive pest *Bemisia tabaci*: evidence of limited but persistent genetic differentiation in glasshouse populations. *Heredity* **100**, 316-325.
- Darby AC, Choi JH, Wilkes T, Hughes MA, Werren JH, Hurst GD, Colbourne JK (2010) Characteristics of the genome of *Arsenophonus nasoniae*, son-killer bacterium of the wasp *Nasonia*. *Insect Molecular Biology* **19 Suppl 1**, 75-89.
- Davis MJ, Ying Z, Brunner BR, Pantoja A, Ferwerda FH (1998) Rickettsial relative associated with papaya bunchy top disease. *Current Microbiology* **36**, 80-84.
- De Barro PJ (2005) Genetic structure of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Asia-Pacific region revealed using microsatellite markers. *Molecular Ecology* **14**, 3695-3718.
- De Barro PJ, Driver F, Trueman JW, Curran J (2000) Phylogenetic relationships of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **16**, 29-36.
- De Barro PJ, Hart PJ (2000) Mating interactions between two biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae) in Australia. *Bulletin of Entomological Research* **90**, 103-112.
- De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB (2010) *Bemisia tabaci*: A Statement of Species Status. *Annual Review of Entomology*.

- De Barro PJ, Scott KD, Graham GC, Lange CL, Schutze MK (2003) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci*. *Molecular Ecology Notes* **3**, 40-43.
- De la Rua P, Simon B, Cifuentes D, Martinez-Mora C, Cenis JL (2006) New insights into the mitochondrial phylogeny of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae) in the Mediterranean Basin. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **44**, 25-33.
- Dedine F, Vavre F, Shoemaker DD, Boulétreau M (2004) Intra-individual coexistence of a *Wolbachia* strain required for host oogenesis with two strains inducing cytoplasmic incompatibility in the wasp *Asobara tabida*. *Evolution* **58**, 2167-2174.
- Delatte H, David P, Granier M, Lett JM, Goldbach R, Peterschmitt M, Reynaud B (2006) Microsatellites reveal extensive geographical, ecological and genetic contacts between invasive and indigenous whitefly biotypes in an insular environment. *Genetics Research* **87**, 109-124.
- Delatte H, Duyck PF, Triboire A, David P, Becker N, Bonato O, Reynaud B (2009a) Bioecology of the invasive B biotype compared to the indigenous Ms biotype of *Bemisia tabaci* in La Réunion. *Biological Invasions* **11**, 1059-1070.
- Delatte H, Duyck PF, Triboire A, David P, Becker N, Bonato O, Reynaud B (2009b) Differential invasion success among biotypes: case of *Bemisia tabaci*. *Biological Invasions* **11**, 1059-1070.
- Delatte H, Holota H, Warren BH, Becker N, Thierry M, Reynaud B (*In Press*) Genetic diversity, geographical range and origin of *Bemisia tabaci* biotype Ms. *Bulletin of Entomological Research*.
- Delatte H, Lett JM, Lefeuvre P, Reynaud B, Peterschmitt M (2007) An insular environment before and after TYLCV introduction. In: *Tomato yellow leaf curl virus disease, Management, molecular biology, breeding for resistance* (ed. Czosnek H), pp. 13-23. Springer, Dordrecht, The Netherlands, Dordrecht.
- Delatte H, Reynaud B, Granier M, Thornary L, Lett JM, Goldbach R, Peterschmitt M (2005) A new silverleaf-inducing biotype Ms of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) indigenous of the islands of the south-west Indian Ocean. *Bulletin of Entomological Research* **95**, 29-35.
- Deniel C, Kieffer G, Lecointre J (1992) New ²³⁰Th-²³⁸U and ¹⁴C age determinations from Piton des Neiges volcano, Reunion -- A revised chronology for the Differentiated Series. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* **51**, 253-267.

- Dinsdale A, Cook L, Riginos C, Buckley YM, Barro PD (2010) Refined Global Analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 to Identify Species Level Genetic Boundaries. *Annals of the Entomological Society of America* **103**, 196-208.
- Dobzhansky T (1937) *Genetics and the origin of species* Columbia University Press, New York, 364pp.
- Dobzhansky T (1970) *Genetics of the Evolutionary process* Columbia University Press, New York, 505pp.
- Douglas AE, Francois CLMJ, Minto LB (2006) Facultative 'secondary' bacterial symbionts and the nutrition of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Physiological Entomology* **31**, 262-269.
- Dres M, Mallet J (2002) Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* **357**, 471-492.
- Drost YC, van Lenteren JC, van Roermund HJW (1998) Life-history parameters of different biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in relation to temperature and host plant: a selective review. *Bulletin of Entomological Research* **88**, 219-229.
- Duffus JE, Larsen RC, Liu HY (1986) Lettuce infectious yellows virus - A new type of whitefly-transmitted virus. *Phytopathology* **76**, 97-100.
- Duron O, Bouchon D, Boutin S, Bellamy L, Zhou L, Engelstadter J, Hurst GD (2008a) The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol* **6**, 27.
- Duron O, Hurst GD, Hornett EA, Josling JA, Engelstadter J (2008b) High incidence of the maternally inherited bacterium *Cardinium* in spiders. *Molecular Ecology* **17**, 1427-1437.
- Duron O, Wilkes TE, Hurst GD (2010) Interspecific transmission of a male-killing bacterium on an ecological timescale. *Ecology Letters* **13**, 1139-1148.
- Engelstadter J, Hurst GDD (2009) The Ecology and Evolution of Microbes that Manipulate Host Reproduction. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **40**, 127-149.
- Engelstadter J, Telschow A (2009) Cytoplasmic incompatibility and host population structure. *Heredity* **103**, 196-207.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.

- Everett KD, Thao M, Horn M, Dyszynski GE, Baumann P (2005) Novel chlamydiae in whiteflies and scale insects: endosymbionts 'Candidatus Fritschea bemisiae' strain Falk and 'Candidatus Fritschea eriococci' strain Elm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 1581-1587.
- Everett KDE, Hornung LJ, Andersen AA (1999) Rapid Detection of the Chlamydiaceae and Other Families in the Order Chlamydiales: Three PCR Tests. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 575-580.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.
- Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M, Zhou X (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* **153**, 783-821.
- Feder JL, Chilcote CA, Bush GL (1989) Are the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*, and blueberry maggot, *R. mendax*, distinct species? Implications for sympatric speciation. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **51**, 113-123.
- Feder JL, Opp SB, Wlazole B, Reynolds K, Go W, Spisak S (1994) Host fidelity is an effective premating barrier between sympatric races of the apple maggot fly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 7990-7994.
- Feldhaar H, Gross R (2009) Insects as hosts for mutualistic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* **299**, 1-8.
- Ferree PM, Avery A, Azpurua J, Wilkes T, Werren JH (2008) A bacterium targets maternally inherited centrosomes to kill males in *Nasonia*. *Current Biology* **18**, 1409-1414.
- Frappa C (1937) Description du *Bemisia manihotis* n. sp. (Hem. Hom Aleurodidae) nuisible au manioc a Madagascar. *Bulletin Economique de Madagascar* **11**, 267-268.
- Frohlich DR, Torres-Jerez I, Bedford ID, Markham PG, Brown JK (1999a) A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology* **8**, 1683-1691.
- Frohlich DR, Torres-Jerez II, Bedford ID, Markham PG, Brown JK (1999b) A phylogeographical analysis of the *bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology* **8**, 1683-1691.
- Futuyma DJ (1986) *Evolutionary biology* Sinauer Associates, 600pp.
- Ganeshan S, Abeeluck D (2000) First record of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Hemiptera : Aleyrodidae), from Mauritius. *African Entomology* **8**, 303-304.

- Gennadius P (1889) Disease of tobacco plantations in the Trikonía. The aleyrodid of tobacco. *Ellenike Georgia* **5**, 1-13.
- Gerling D (1990) *Whiteflies : their bionomics, pest status and management* Intercept Ltd, Andover, Hants (UK), 348pp.
- Ghanim M, Kontsedalov S (2009) Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities. *Pest Management Science* **65**, 939-942.
- Gil R, Silva FJ, Zientz E, Delmotte F, Gonzalez-Candelas F, Latorre A, Rausell C, Kamerbeek J, Gadau J, Holldobler B, van Ham RC, Gross R, Moya A (2003) The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: comparative analysis of reduced genomes. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* **100**, 9388-9393.
- Gill RJ (1990) The morphology of whiteflies. In: *Whiteflies: their Bionomics, Pest Status and Management* (ed. Gerling D), pp. 13–46. Intercept Ltd., Andover, Hants, UK.
- Gotoh T, Noda H, Ito S (2006) Cardinium symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. *Heredity* **98**, 13-20.
- Gottlieb Y, Ghanim M, Gueguen G, Kontsedalov S, Vavre F, Fleury F, Zchori-Fein E (2008) Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies. *Faseb Journal* **22**, 2591-2599.
- Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Mozes-Daube N, Kontsedalov S, Skaljic M, Brumin M, Sobol I, Czosnek H, Vavre F, Fleury F, Ghanim M (2010) The transmission efficiency of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. *Journal of Virol* **84**, 9310-9317.
- Greathead AH (1986) Host plants. In: *Bemisia tabaci - a literature survey* (ed. Cock MJW), pp. 17-25. FAO and CAB, Ascot (UK).
- Gueguen G, Rolain JM, Zchori-Fein E, Vavre F, Fleury F, Raoult D (2009) Molecular detection and identification of *Rickettsia* endosymbiont in different biotypes of *Bemisia tabaci*. *Clinical Microbiology Infection*, **15**, 271-272.
- Gueguen G, Vavre F, Gnankine O, Peterschmitt M, Charif D, Chiel E, Gottlieb Y, Ghanim M, Zchori-Fein E, Fleury F (2010) Endosymbiont metacommunities, mtDNA diversity and the evolution of the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) species complex. *Molecular Ecology*, **19**, 4365–4376
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**, 696-704.

- Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O (2005) PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research* **33**, W557-559.
- Gunning RV, Byrne FJ, Conde BD, Connelly MI, Hergstrom K, Devonshire AL (1995) First report of B-biotype *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia. *Journal of Austral entomological Society* **34**, 116-120.
- Hagimori T, Abe Y, Date S, Miura K (2006) The first finding of a Rickettsia bacterium associated with parthenogenesis induction among insects. *Current Microbiology* **52**, 97-101.
- Hansen AK, Jeong G, Paine TD, Stouthamer R (2007) Frequency of secondary symbiont infection in an invasive psyllid relates to parasitism pressure on a geographic scale in California. *Applied of Environmental Microbiology* **73**, 7531-7535.
- Heath BD, Butcher RDJ, Whitfield WGF, Hubbard SF (1999) Horizontal transfer of Wolbachia between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Current Biology* **9**, 313-316.
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN (2008) Wolbachia and virus protection in insects. *Science* **322**, 702.
- Hiroki M, Kato Y, Kamito T, Miura K (2002) Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). *Naturwissenschaften* **89**, 167-170.
- Horowitz A, Denholm I, Gorman K, Cenis JL, Kontsedalov S, Ishaaya I (2003) Biotype Q of *Bemisia tabaci* identified in Israel *Phytoparasitica* **31**, 94-98-98.
- Horowitz AR, Kontsedalov S, Khasdan V, Ishaaya I (2005) Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **58**, 216-225.
- Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Shimada M, Fukatsu T (2006) Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biology* **4**, e337.
- Huigens ME, Stouthamer R (2003) Parthenogenesis associated with Wolbachia. In: *Insect Symbiosis* (eds. Bourtzis K, Miller TA), pp. 247–266. CRC Press: Boca Raton, Florida.
- Hunter MS, Perlman SJ, Kelly SE (2003) A bacterial symbiont in the Bacteroidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. *Proceedings of the Royal Society of the B Biological Sciences* **270**, 2185-2190.

- Hunter MS, Woolley JB (2001) Evolution and behavioural ecology of Heteronomous Aphelinid parasitoids. *Annual Review of Entomology* **46**, 251-290.
- Hurst LD (1991) The Incidences and Evolution of Cytoplasmic Male Killers. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **244**, 91-99.
- Ishikawa H (2003) Insect symbiosis: an introduction. In: *Insect Symbiosis* (eds. Bourtzis K, Miller TA), pp. 1-21. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Jaenike J (2007) Spontaneous emergence of a new Wolbachia phenotype. *Evolution* **61**, 2244-2252.
- Jaenike J, Dyer KA, Cornish C, Minhas MS (2006) Asymmetrical reinforcement and Wolbachia infection in *Drosophila*. *PLoS Biology* **4**, e325.
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 424-429.
- Jombart T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* **24**, 1403-1405.
- Jones D (2003a) Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 195-219.
- Jones DR (2003b) Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 195-219.
- Khasdan V, Levin I, Rosner A, Morin S, Kontsedalov S, Maslenin L, Horowitz AR (2005) DNA markers for identifying biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae) and studying population dynamics. *Bulletin of Entomological Research* **95**, 605-613.
- Kontsedalov S, Zchori-Fein E, Chiel E, Gottlieb Y, Inbar M, Ghanim M (2008) The presence of *Rickettsia* is associated with increased susceptibility of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides. *Pest Management Science* **64**, 789-792.
- Lane R (1997) The species concept in blood-sucking vectors of human diseases. In: *Species, the Units of Biodiversity* (ed. Claridge MF, Dawah, H.A, Wilson, M.R.), pp. 273–289. Chapman & Hall, London.
- Lee CE (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 386-391.
- Legg JP (1995) *The ecology of Bemisia tabaci (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae), vector of African cassava mosaic geminivirus in Uganda* Ph.D. thesis, University of Reading.

- Leonardo TE, Muir GT (2003) Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. *Proceedings of the Royal Society of the B Biological Sciences* **270 Suppl 2**, S209-212.
- Liu SS, De Barro PJ, Xu J, Luan JB, Zang LS, Ruan YM, Wan FH (2007) Asymmetric mating interactions drive widespread invasion and displacement in a whitefly. *Science* **318**, 1769-1772.
- Lockwood JL, Hoopes MF, Marchetti MP (2007) *Invasion ecology* Blackwell Pub, 304pp.
- Luo C, Jones CM, Devine G, Zhang F, Denholm I, Gorman K (2010) Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* biotype Q (Hemiptera: Aleyrodidae) from China. *Crop Protection* **29**, 429-434.
- Luziau R (1953) Contribution à la prospection phytosanitaire de l'île de la Réunion. *Phytoma* **6**, 13-19.
- Ma CS, Hau B, Poehling HM (2004) Effects of pattern and timing of high temperature exposure on reproduction of the rose grain aphid, *Metopolophium dirhodum*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **110**, 65-71.
- Ma W, Li X, Dennehy TJ, Lei C, Wang M, Degain BA, Nichols RL (2010) Pyriproxyfen resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biotype B: metabolic mechanism. *Journal of Economic Entomology* **103**, 158-165.
- Margulis L, Fester R (1991) *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis* MIT Press.
- Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P (2010) RDP3: A flexible and fast computer program for analysing recombination. *Bioinformatics*.
- Martin G, Juchault P, Sorokine O, Van Dorsselaer A (1990) Purification and characterization of androgenic hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). *General and Comparative Endocrinology* **80**, 349-354.
- Maruthi MN, Colvin J, Thwaites RM, Banks GK, Gibson G, Seal SE (2004) Reproductive incompatibility and cytochrome oxidase I gene sequence variability amongst host-adapted and geographically separate *Bemisia tabaci* populations (Hemiptera : Aleyrodidae). *Systematic Entomology* **29**, 560-568.
- Mayr E (1963) *Animal species and evolution* Harvard University Press, Cambridge, MA, 797pp.
- McCutcheon JP, McDonald BR, Moran NA (2009) Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* **106**, 15394-15399.

- Melbourne BA, Cornell HV, Davies KF, Dugaw CJ, Elmendorf S, Freestone AL, Hall RJ, Harrison S, Hastings A, Holland M, Holyoak M, Lambrinos J, Moore K, Yokomizo H (2007) Invasion in a heterogeneous world: resistance, coexistence or hostile takeover? *Ecology Letters* **10**, 77-94.
- Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH (2002) Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology* **27**, 189-195.
- Mooney HA, Cleland EE (2001) The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5446-5451.
- Moran NA, Baumann P (2000) Bacterial endosymbionts in animals. *Current Opinion of Microbiology* **3**, 270-275.
- Moran NA, Dunbar HE (2006) Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **103**, 12803-12806.
- Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics* **42**, 165-190.
- Moran NA, Munson MA, Baumann P, Ishikawa H (1993) A Molecular Clock in Endosymbiotic Bacteria is Calibrated Using the Insect Hosts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **253**, 167-171.
- Moran NA, Tran P, Gerardo NM (2005) Symbiosis and insect diversification: an ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum Bacteroidetes. *Applied Environmental Microbiology* **71**, 8802-8810.
- Mound LA, Halsey SH (1978) *Whitefly of the World*, John Wiley & Sons edn. British Museum (Natural History), Chichester.
- Moya A, Guirao P, Cifuentes D, Beitia F, Cenis JL (2001) Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Molecular Ecology* **10**, 891-897.
- Muniyappa V (1983) Transmission of cowpea mild virus by *Bemisia tabaci* in a nonpersistent manner. *Plant Disease* **67**, 391-393.
- Muniz M (2000) Host suitability of two biotypes of *Bemisia tabaci* on some common weeds. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **95**, 63-70.
- Muniz M, Nombela G (2001) Differential variation in development of the B- and Q-biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae) on sweet pepper at constant temperatures. *Environmental Entomology* **30**, 720-727.

- Nakanishi K, Hoshino M, Nakai M, Kunimi Y (2008) Novel RNA sequences associated with late male killing in *Homona magnanima*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **275**, 1249-1254.
- Narita S, Kageyama D, Nomura M, Fukatsu T (2007) Unexpected mechanism of symbiont-induced reversal of insect sex: feminizing *Wolbachia* continuously acts on the butterfly *Eurema hecabe* during larval development. *Applied Environmental Microbiology* **73**, 4332-4341.
- Negri I, Pellicchia M, Mazzoglio PJ, Patetta A, Alma A (2006) Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **273**, 2409-2416.
- Nirgianaki A, Banks GK, Frohlich DR, Veneti Z, Braig HR, Miller TA, Bedford ID, Markham PG, Savakis C, Bourtzis K (2003) *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Current Microbiology* **47**, 93-101.
- Novakova E, Hypsa V, Moran NA (2009) *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *BMC Microbiol* **9**, 143.
- Oliveira MRV, Henneberry TJ, Anderson P (2001) History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection* **20**, 709-723.
- Oliver KM, Degnan PH, Burke GR, Moran NA (2010) Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annual Review of Entomology* **55**, 247-266.
- Oliver KM, Moran NA, Hunter MS (2005) Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **102**, 12795-12800.
- Oliver KM, Moran NA, Hunter MS (2006) Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**, 1273-1280.
- Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **100**, 1803-1807.
- Pascual S (2006) Mechanisms in competition, under laboratory conditions, between Spanish biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Spanish Journal of Agricultural Research* **4**, 351-354.

- Paulson GS, Beardsley JW (1985) Whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) egg pedicel insertion into host plant stomata. *Annual entomology Society of America* **78**, 506-508.
- Perlman SJ, Hunter MS, Zchori-Fein E (2006) The emerging diversity of Rickettsia. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**, 2097-2106.
- Perlman SJ, Kelly SE, Hunter MS (2008) Population biology of cytoplasmic incompatibility: maintenance and spread of Cardinium symbionts in a parasitic wasp. *Genetics* **178**, 1003-1011.
- Perring TM (2001) The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection* **20**, 725-737.
- Perring TM, Cooper AD, Rodriguez RJ, Farrar CA, Bellows TS (1993) Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science* **259**, 74-77.
- Peterschmitt M, Granier M, Mekdoud R, Dalmon A, Gambin O, Vayssières JF, Reynaud B (1999) First report of tomato yellow leaf curl virus in Réunion Island. *Plant Disease* **83**, 303.
- Phillips PC (2008) Epistasis [mdash] the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews Genetics* **9**, 855-867.
- Posada D (2006) ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Research* **34**, W700-703.
- Presgraves DC, Balagopalan L, Abmayr SM, Orr HA (2003) Adaptive evolution drives divergence of a hybrid inviability gene between two species of Drosophila. *Nature* **423**, 715-719.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Quaintance AL, Baker AC (1914) Classification of the Aleyrodidae Part II. *Technical Series, Department of Agriculture Bureau of Entomology, United States* **27**, 95-109.
- R Development Core Team (2009) *R: A language and environment for statistical computing* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramsey J, Bradshaw HD, Jr., Schemske DW (2003) Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution* **57**, 1520-1534.
- Reitz SR, Trumble JT (2002) Competitive displacement among insects and arachnids. *Annual Review of Entomology* **47**, 435-465.
- Reynaud B, Wuster G, Delatte H, Soustrade I, Lett JM, Gambin O, Peterschmitt M (2003) Les maladies à bégomovirus chez la tomate dans les départements français d'Outre-Mer. *Phytoma* **562**, 13-17.

- Rogers SM, Bernatchez L (2006) The genetic basis of intrinsic and extrinsic post-zygotic reproductive isolation jointly promoting speciation in the lake whitefish species complex (*Coregonus clupeaformis*). *Journal of Evolutionary Biology* **19**, 1979-1994.
- Ronda M, Adan A, Cifuentes D, Cenis JL, Beitia F (1999) Laboratory evidence of interbreeding between biotypes of *Bemisia Tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae) present in Spain, 83.
- Rossell RC, Torres-Jerez I, Brown JK (1997) Temporal monitoring of geminivirus DNA in whitefly hemolymph by polymerase chain reaction (PCR) (abstract). *Phytopathology* **87**, 83.
- Rousset F (2008) GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.
- Rundle HD, Nosil P (2005) Ecological speciation. *Ecology Letters* **8**, 336-352.
- Russell JA, Latorre A, Sabater-Munoz B, Moya A, Moran NA (2003) Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Molecular Ecology* **12**, 1061-1075.
- Russell JA, Moran NA (2006) Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**, 603-610.
- Russell LM (1957) Synonyms of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera, Aleyrodidae). *Bulletin of the Brooklyn Entomological Society* **52**, 122-123.
- Sandstrom JP, Russell JA, White JP, Moran NA (2001) Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Molecular Ecology* **10**, 217-228.
- Scarborough CL, Ferrari J, Godfray HCJ (2005) Aphid Protected from Pathogen by Endosymbiont. *Science* **310**, 1781.
- Servedio MR, Noor MAF (2003) The Role of Reinforcement in Speciation: Theory and Data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**, 339-364.
- Sery S (2007) *Elements d'évolution d'une filière agricole, « la Tomate » à la Réunion : les prix, les modes de production et la protection phytosanitaire*, Université de la Réunion.
- Simmons AM, McCutcheon G, Dufault RJ, Hassell RL, Rushing JW (2000) *Bemisia argentifolii* (Homoptera : Aleyrodidae) attacking species of medicinal herbal plants. *Annals of the Entomological Society of America* **93**, 856-861.

- Simon B, Cenis JL, De La Rua P (2007) Distribution patterns of the Q and B biotypes of *Bemisia tabaci* in the Mediterranean Basin based on microsatellite variation. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **124**, 327-336.
- Skaljac M, Zanic K, Ban SG, Kontsedalov S, Ghanim M (2010) Co-infection and localization of secondary symbionts in two whitefly species. *BMC Microbiology* **10**, 142.
- Stahlhut JK (2010) The endosymbiont community as taxonomic character: a novel approach to resolving the *Bemisia tabaci* complex. *Molecular Ecology* **19**, 4102-4104.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.
- Telschow A, Flor M, Kobayashi Y, Hammerstein P, Werren JH (2007) Wolbachia-induced unidirectional cytoplasmic incompatibility and speciation: mainland-island model. *PLoS ONE* **2**, e701.
- Telschow A, Hammerstein P, Werren JH (2005) The effect of Wolbachia versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. *Evolution* **59**, 1607-1619.
- Thao ML, Baumann L, Hess JM, Falk BW, Ng JCK, Gullan PJ, Baumann P (2003) Phylogenetic evidence for two new insect-associated chlamydia of the family Simkaniaceae. *Current Microbiology* **47**, 46-50.
- Thao ML, Baumann P (2004) Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 3401-3406.
- Thao ML, Clark MA, Baumann L, Brennan EB, Moran NA, Baumann P (2000) Secondary endosymbionts of psyllids have been acquired multiple times. *Current Microbiology* **41**, 300-304.
- Thierry M, Becker N, Hajri A, Reynaud B, Lett JM, Delatte H (*In Press*) Symbiont diversity and non-random hybridisation among indigenous (Ms) and invasive (B) biotypes of *Bemisia tabaci*. *Molecular Ecology*.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T (2004) Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* **303**, 1989.

- Turelli M, Barton NH, Coyne JA (2001) Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 330-343.
- Ueda S, Brown JK (2006) First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in Japan by mitochondrial cytochrome oxidase I sequence analysis. *Phytoparasitica* **34**, 405-411.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.
- Varma A, Malathi VG (2003) Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* **142**, 145-164.
- Vautrin E, Charles S, Genieys S, Vavre F (2007) Evolution and invasion dynamics of multiple infections with Wolbachia investigated using matrix based models. *Journal of Theoretical Biology* **245**, 197-209.
- Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Boulétreau M (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of Wolbachia in host-parasitoid associations. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 1711-1723.
- Via S (1999) Reproductive isolation between sympatric races of pea aphids. I. Gene flow restriction and habitat choice. *Evolution* **53**, 1446-1457.
- Wade MJ, Patterson H, Chang NW, Johnson NA (1994) Postcopulatory, prezygotic isolation in flour beetles. *Heredity* **72** (Pt 2), 163-167.
- Wallace AR (1880) *Island Life: Or, the Phenomena and Causes of Insular Faunas and Floras, Including a Revision and Attempted Solution of the Problem of Geological Climates* Macmillan, 540pp.
- Wallin IE (1927) *Symbioticism and the Origin of Species* William and Wilkins, Baltimore.
- Weeks AR, Marec F, Breeuwer JA (2001) A mite species that consists entirely of haploid females. *Science* **292**, 2479-2482.
- Weeks AR, Velten R, Stouthamer R (2003) Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **270**, 1857-1865.
- Wernegreen JJ (2002) Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics* **3**, 850-861.
- Werren JH (1997) Biology of Wolbachia. *Annual Review of Entomology* **42**, 587-609.
- Werren JH, Jaenike J (1995) Wolbachia and cytoplasmic incompatibility in mycophagous *Drosophila* and their relatives. *Heredity* **75** (Pt 3), 320-326.

- Whittaker RJ (1998) *Island biogeography: ecology, evolution, and conservation* Oxford University Press, 285pp.
- Williamson MH (1996) *Biological invasions* Chapman & Hall, 244pp
- Xu J, De Barro PJ, Liu SS (2010) Reproductive incompatibility among genetic groups of *Bemisia tabaci* supports the proposition that the whitefly is a cryptic species complex. *Bulletin of Entomological Research* **100**, 359-366.
- Yen JH, Barr AR (1971) New Hypothesis of the Cause of Cytoplasmic Incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature* **232**, 657-658.
- Yokomi RK, Jimenez DR, Osborne LS, Shapiro JP (1995) Comparison of silverleaf whitefly-induced and chlormequat chloride-induced leaf silvering in *Cucurbita pepo*. *Plant Disease*. **79**, 950-955.
- Zang LS, Chen WQ, Liu SS (2006) Comparison of performance on different host plants between the B biotype and a non-B biotype of *Bemisia tabaci* from Zhejiang, China. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*. **121**, 221-227.
- Zchori-Fein E (2010) Plant-mediated horizontal transmission of *Rickettsia* in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. In: *6th International Wolbachia Conference*, ASilomar, California.
- Zchori-Fein E, Brown JK (2002) Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera : Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America* **95**, 711-718.
- Zchori-Fein E, Gottlieb Y, Kelly SE, Brown JK, Wilson JM, Karr TL, Hunter MS (2001) A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 12555-12560.
- Zchori-Fein E, Perlman SJ (2004) Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Molecular Ecology* **13**, 2009-2016.
- Zhang LP, Zhang YJ, Zhang WJ, Wu QJ, Xu BY, Chu D (2005) Analysis of genetic diversity among different geographical populations and determination of biotypes of *Bemisia tabaci* in China. *Journal of Applied Entomology* **129**, 121-128.

Curriculum vitae

Articles à comité de lecture

- Chenuil A., Le Gac M., **Thierry M.** (2003) Fast isolation of microsatellite loci of very diverse repeat motifs by library enrichment in echinoderm species, *Amphipholis squamata* and *Echinocardium cordatum*. *Molecular Ecology Notes* 3:324-327.
- Lefeuvre P., Martin D., Hoareau M., Naze F., Delatte H., **Thierry M.**, Varsani A., Becker N., Reynaud B., Lett J.M. (2007) Begomovirus "melting pot" in the South West Indian Ocean Islands: molecular diversity and evolution through recombination. *Journal of General Virology* 88:3458-68.
- Delatte H., Holota H., Warren B.H., Becker N., **Thierry M.**, Reynaud B. (2011) Genetic diversity, geographical range and origin of *Bemisia tabaci* biotype Ms. *Bulletin of Entomological Research* *In Press*.
- Thierry M.**, Becker N., Hajri A., Lett J.M., Reynaud B., Delatte H. (2011) Symbiont diversity and non-random hybridisation among indigenous (Ms) and invasive (B) biotypes of *Bemisia tabaci*. *Molecular Ecology* *In Press*.
- Thierry M.**, Bile A., Grondin M., Reynaud B., Becker N., Delatte H. Evidence from mitochondrial and endosymbiotic data of the *Bemisia tabaci* Q biotype introduction in La Réunion. *In Prep*.
- Thierry M.**, Lefeuvre P., Hoareau M., Delatte H., Becker N., Reynaud B., Martin D.P., Lett J.M. Complex of begomoviruses associated with tobacco leaf curl disease in Comoros: new evidence of a natural interspecific recombinant with a differential disease phenotype. *In Prep*.

Participation à des congrès internationaux

- Thierry M.**, Lefeuvre P., Hoareau M., Delatte H., Becker N., Reynaud B., Martin D. P., Lett J.-M. Begomovirus infecting tobacco in Comoros: molecular and biological characterization. 14th International Bioinformatics Workshop on Virus Evolution and Molecular Epidemiology, Cape-Town, Afrique du Sud, 11 - 15 septembre 2008.
- Thierry M.**, Becker N., Reynaud B., Lett J.-M., Delatte H. Diversity of endosymbiotic community in *Bemisia tabaci* population on Réunion Island. Fifth International Bemisia Workshop, Guangzhou, China, 9-11 novembre 2009.
- Thierry M.**, Becker N., Reynaud B., Lett J.-M., Delatte H. Diversity of endosymbiotic community in *Bemisia tabaci* population on Réunion Island. Sixth international Wolbachia conference, Monterey, USA, 9-14 juin 2010.